

---

Lehrstuhl für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie  
Universität Regensburg  
Prof. Dr. med. H. F. Grobecker

---

**Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik verschiedener  
galenischer Formulierungen des Immunsuppressivums Cyclosporin A vor und nach  
Nierentransplantation an Ratten**

---



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Apotheker Jens Köhler  
aus Regensburg

2002

---

---

## **Promotionsgesuch**

Eingereicht am: 08.03.2002

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. F. Grobecker

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. med. B.K. Krämer

Mündliche Prüfung: 12.04.2002

Die Arbeit wurde angeleitet von Herrn Prof. Dr. med. H. Grobecker

Prüfungsausschuß: Prof. Dr. rer.nat. Franz

Prof. Dr. med. H. Grobecker

Prof. Dr. med. A. Krämer

Prof. Dr. med. K. Kurtz

---

Teile der Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

- a) In der wissenschaftlichen Zeitschrift ***Drug Metabolism and Disposition*** der American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics (ASPET). Accepted 26.02.2002; Vol. 30 (6); in press.

Jens Koehler et al., *Comparison of Bioavailability and Metabolism with two Commercial Formulations of Cyclosporine A in Rats*

- b) Als Posterpräsentation auf der Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) am 14.03.2002 in Mainz. Abstract in der wissenschaftlichen Zeitschrift ***Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology***. Accepted 29.01.2002; Vol. 365 S1 Abstract 400 .

Jens Koehler et al., *Comparison of Bioavailability and Metabolism within two Commercial Formulations of Cyclosporine A in Rats and Renal Transplanted Rats*

---

*Meinen Eltern und Beate*

---

Die Dissertation entstand unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. H. F. Grobecker in der Zeit von Januar 2001 bis April 2002 am Lehrstuhl für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Universität Regensburg.

Meinem akademischen Lehrer

**Prof. Dr. med. H. F. Grobecker**

möchte ich meinen Dank für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes an seinem Lehrstuhl aussprechen. Sein persönliches Engagement und seine hilfreichen Anregungen sowie sein umfassendes Fachwissen, mit dem er mir stets zur Seite stand, ermöglichten mir ein zielstrebiges Arbeiten. Ich erlangte Sicherheit und Vertrauen durch seine konstruktive und kritische Diskussion der erhaltenen Ergebnisse.

Danken möchte ich des Weiteren

Herrn Prof. Dr. rer. nat. F. Kees für seine Unterstützung bei der HPLC Analyse, sowie seiner zahlreichen sehr hilfreichen Anmerkungen. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr für alle Arten von Problemen.

Herrn Prof. Dr. med. E. Krämer für seine kompetente Bewertung der Ergebnisse und seinen Einladungen zu den nephrologischen Kolloquien.

Herrn Prof. Dr. med. A. Kurtz für die Unterstützung bei der mRNA Analytik, sowie der histologischen Präparation und Immunohistochemie der Nierenschnitte.

Herrn Apotheker Dr. rer. nat. K. Höcherl, der mich mit viel Geduld in das wissenschaftliche Arbeiten einführte und stets unterstützte.

Herrn OA Dr. med. T. Kühnel, ohne dessen geduldige Anleitung in der Mikrochirurgie die Arbeit nicht zu Stande gekommen wäre.

Herrn Dr. med. M. Bucher und Herrn OA Dr. med. K. P. Ittner, die mir in medizinischen sowie in theoretischen Fragen immer zur Seite standen.

Frau Astrid Seefeld und Frau G. Wilberg für die Mithilfe in der Analytik sowie der praktischen Anleitung.

Meinen Kollegen Frau Apothekerin F. Dreher und Herrn Apotheker S. Ladenburger, sowie Frau S. Kirsch und Frau R. Prenzyna für die freundliche Zusammenarbeit am Lehrstuhl.

Sowie allen Kollegen, die am Gelingen der Arbeit beteiligt waren und deren Namen hier nicht ausdrücklich erwähnt werden

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1	Allgemeines.....	10
1.2	Nierentransplantation.....	11
1.3	Transplantationsimmunologie.....	13
1.4	Herkunft und Verteilung der Organe, Transplantationsgesetz.....	16
1.5	Durchführung der Operation und Prognose.....	17
1.6	Immunsuppressive Therapie und das Drug Monitoring.....	19
1.7	Pharmakologie und Galenik des Cyclosporin A.....	20
1.7.1	Bioverfügbarkeit.....	20
1.7.2	Technologie der Mikroemulsion.....	21
1.7.3	Pharmakodynamik.....	22
1.7.4	Unerwünschte Wirkungen.....	23
1.8	Calcineurin-Phosphatase: Struktur und Funktion.....	25
<b>2</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>27</b>
2.1	Problematik der Generika des Sandimmun Neoral®.....	27
2.2	Untersuchungen zu Generika des Sandimmun Neoral®.....	28
2.3.	Der Zusammenhang zwischen Nephrotoxizität, Transplantatabstoßung und dem Metabolismus des Cyclosporin A.....	29
<b>3</b>	<b>Materialien</b>	<b>31</b>
3.1	Versuchstiere.....	31
3.2	Chemikalien und Pharmaka.....	31
3.2.1	Chemikalien.....	31
3.2.2	Pharmaka.....	33
3.3	Geräte und Instrumente.....	33
3.4	Verwendete konventionelle analytische Methoden.....	34
3.5	Statistik.....	35
3.6	Abkürzungsverzeichnis.....	36
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>39</b>
4.1	Tierhaltung.....	38
4.2	Planung und Durchführung der Tierversuche.....	38
4.2.1	Dosisfindung und Überprüfung der Dosislinearität.....	38
4.2.2	Vergleichende Untersuchungen von 3 Formulierungen des CsA an nierentransplantierten Ratten.....	39
4.2.3	Bestimmung der Pharmakokinetik des Cyclosporin A.....	41
4.2.4	Untersuchungen zur Pharmakokinetik des Cyclosporin A nach Nierentransplantation.....	41

4.2.5	Applikation und Dosierung der Cyclosporin A Kapseln.....	42
4.2.6	Plethysmographische Blutdruckmessung.....	43
4.2.7	Vorbereitung der Versuchstiere auf die Transplantation.....	43
4.2.8	Nierentransplantation und Mikrochirurgie.....	45
4.2.9	Dekapitation und Organentnahme.....	48
4.3	Isolierung der RNA.....	49
4.3.1	Gewinnung der gesamten RNA.....	49
4.4	Quantifizierung der mRNA mit dem RNase Protection Assay.....	50
4.4.1	Herstellen einer komplementären radioaktiven cRNA-Sonde.....	50
4.4.2	Hybridisierung der RNA-Proben.....	52
4.4.3	Gelelektrophorese und Signalauswertung der Röntgenfilme.....	52
4.5	Quantitative Analyse des Cyclosporin A und dessen Metaboliten in verschiedenen biologischen Matrices mittels HPLC.....	53
4.5.1	Probenvorbereitung.....	54
4.5.2	Methodenentwicklung und Kalibrierung der HPLC.....	54
4.5.3	Gehaltsberechnung und Beispielchromatogramme.....	55
4.6	Histologische Untersuchungen.....	57
4.6.1	Probengewinnung, -fixierung und Einbetten in Paraffin.....	57
4.6.2	Färben der Präparate und Immunohistochemie.....	57

---

<b>5</b>	<b>Metabolismus des Cyclosporin A</b>	<b>59</b>
----------	---------------------------------------	-----------

---

5.1.	Chemische Konstitution des Cyclosporin A und seiner Metaboliten.....	59
5.2	Nomenklatur und Klassifizierung der Metaboliten.....	60
5.3	Genese und Verteilung der Metaboliten.....	63
5.4	Toxizität der Metaboliten.....	64

---

<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>66</b>
----------	-------------------	-----------

---

6.1	Dosislinearität und dosisabhängige Metabolisierung des CsA.....	67
6.1.1	Dosislinearität des Cyclosporin A im Vollblut, Nieren-, Leber- und Thymusgewebe.....	67
6.1.2.	Verhältnis der Metabolitenkonzentrationen zu den Cyclosporin A Gehalten.....	68
6.1.3	Dosis-Wirkungsbeziehungen des Cyclosporin A auf verschiedene Genexpressionen in der Niere.....	68
6.1.3.1	Auswirkung auf die mRNA Genexpression des Renins.....	69
6.1.3.2	Auswirkung auf die mRNA Genexpression der COX-1 und -2.....	70
6.1.3.3	Auswirkung auf die mRNA Genexpression der ET <sub>A</sub> und ET <sub>B</sub> Rezeptoren.....	70
6.1.3.4	Auswirkung auf die mRNA Genexpression des Kollagens-1, -3 und Fibrinogens.....	70
6.2	Vergleichende Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und des Metabolismus des CsA an nierentransplantierten Ratten.....	72

6.2.1	Talspiegel des CsA und der Metaboliten.....	73
6.2.1.1	Talspiegel im Vollblut.....	73
6.2.1.2	Talspiegel im Nierengewebe.....	75
6.2.1.3	Talspiegel im Lebergewebe.....	78
6.2.1.4	Talspiegel im Thymusgewebe.....	80
6.2.1.5	Talspiegel im Milzgewebe.....	82
6.2.2	Ausscheidungsrate des Cyclosporin A und der Metaboliten in den 24h-Sammelurin.....	83
6.2.3	Parameter der Nierenfunktion.....	86
6.2.3.1	Serum Creatinin Werte.....	87
6.2.3.2	8-Isoprostan Ausscheidung in den 24h-Sammelurin.....	88
6.2.4.	Veränderung des systolischen Blutdrucks.....	90
6.2.5	Interleukin-2 Gehalte im Plasma und im Nierengewebe.....	93
6.2.6	Ergebnisse einer unterdosierten Vergleichsgruppe.....	94
6.2.7	Histopathologie der Nieren.....	95
6.2.7.1	Histologische Befunde der Nierenglomeruli.....	96
6.2.7.2	Histologische Befunde der Nierenarteriolen.....	97
6.2.7.3	Histologische Befunde des Nierenmarks.....	98
6.2.8	Quantifizierung verschiedener mRNA Genexpressionen in der Niere.....	99
6.2.8.1	Genexpression der Renin mRNA.....	99
6.2.8.2	Genexpression der COX-2 mRNA.....	100
6.2.8.3	Genexpression der COX-1 mRNA.....	101
6.2.8.4	Genexpression der Endotheline -1 und -3.....	102
6.2.8.5	Genexpression der ET <sub>A</sub> und ET <sub>B</sub> Rezeptoren mRNA.....	103
6.2.8.6	Genexpression der Kollagene-1, -3 und Fibrinogen mRNA.....	104
6.2.8.7.	Immunohistochemische Färbungen des Renins und der COX-2.....	106
6.3	Pharmakokinetische Untersuchungen an nichttransplantierten Ratten.....	109
6.3.1.	Konzentrations-Zeitverläufe des Cyclosporin A im Vollblut und in den Organen Niere, Leber, Milz und Thymus im steady-state....	109
6.3.2	Zeitverlauf des Auftretens von Metaboliten des Cyclosporin A im Vollblut und in den Organen.....	111
6.3.3.	Pharmakokinetische Parameter.....	116
6.4.	Pharmakokinetische Untersuchungen zur veränderten Bioverfügbarkeit und des Metabolismus des CsA nach Nierentransplantation.....	117
6.4.1.	Pharmakokinetische Parameter.....	118
<b>7</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>120</b>
7.1	Die Austauschbarkeit von Original Medikamenten durch Generika bei Pharmaka mit kritischen Arzneistoffen.....	120
7.2	Die Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik des CsA im Vergleich Sandimmun <sup>®</sup> Neoral mit Gengraf <sup>®</sup> und Eonlabs <sup>®</sup> .....	120



7.3	Die Bioverfügbarkeit und der Metabolismus des CsA im Vergleich Sandimmun Neoral mit Gengraf und Eonlabs nach Nierentransplantation.....	121
7.3.1	Blut- und Gewebekonzentrationen des CsA und der Metaboliten...	121
7.3.2	Ausscheidung des CsA und der Metaboliten in den Urin.....	121
7.3.3	Pharmakokinetik des CsA und der Metaboliten nach Nierentransplantation.....	123
7.4	Änderung der Nierenfunktionsparameter und die Nephrotoxizität des CsA nach Nierentransplantation.....	124
7.4.1	Serum Creatinin Spiegel und 8-IP Ausscheidung in den Urin.....	124
7.4.2	Änderung des systolischen Blutdrucks.....	124
7.4.3	Änderung verschiedener mRNA Genexpressionen in der Niere.....	125
7.5	Histologische Befunde.....	125
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>127</b>
8.1	Untersuchungen zur Bioäquivalenz des Sandimmun <sup>®</sup> Neoral, Gengraf <sup>®</sup> und CsA Eonlabs <sup>®</sup> .....	127
8.2	Auswirkungen des CsA auf verschiedene Genexpressionen in der Niere.....	127
8.3	Veränderung des Metabolismus des CsA nach Nierentransplantation.....	127
8.4	Histopathologie der Nieren.....	128
<b>9</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick</b>	<b>129</b>
<b>10</b>	<b>Literatur</b>	<b>130</b>
<b>11</b>	<b>Anhang</b>	<b>155</b>
11.1	Abbildungsverzeichnis.....	155
11.2	Tabellenverzeichnis.....	156
11.3	Organspendeausweis.....	157
11.4	Curriculum Vitae.....	158

---

## 1 Einleitung

### 1.1 Allgemeines

An der Schwelle zum 3. Jahrtausend steht der menschliche Organismus in Kontakt mit einer Vielzahl von schädlichen Umwelteinflüssen und muss sich zudem noch mit Lebensgewohnheiten auseinandersetzen, die seine Gesundheit gefährden. Folglich sieht sich die Menschheit konfrontiert mit einer stark ansteigenden Zahl von Erkrankungen des Herz-Kreislauf Systems, Tumorerkrankungen und Infektionen durch Mikroorganismen und Viren, die man bereits für besiegt hielt.

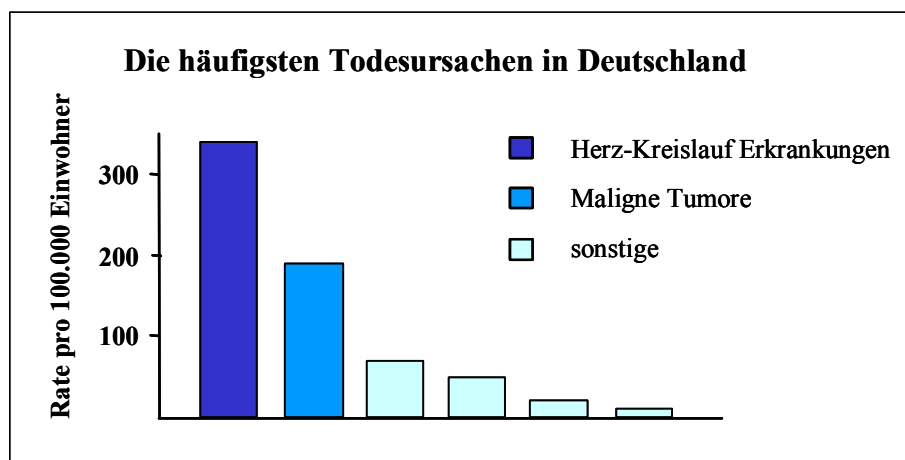


Abb. 01 Statistik Stand 1995, Eurotransplant

Das Immunsystem als unser Abwehrsystem, kann oftmals den vielfältigen Noxen nicht standhalten oder wird sogar in verschiedenen Fällen gegen den eigenen Körper gerichtet aktiviert. Häufig manifestieren sich Autoimmunerkrankungen schon im Kleinkindesalter. Auf lange Sicht gesehen verlaufen Erkrankungen wie z.B. eine persistierende Hypertonie, eine Hepatitisinfektion oder das Tumorwachstum mit einer kontinuierlichen oder aber auch ansteigenden Schädigung von einem oder mehreren Organen. Eine manifeste Hepatitisinfektion kann im ungünstigsten Fall innerhalb weniger Wochen zu einem kompletten Organversagen führen. Viele pathologische Veränderungen werden heutzutage frühzeitig diagnostiziert, wodurch schon im Anfangsstadium eine geeignete Therapie eingeleitet werden kann. So muss heute eine diagnostizierte Hypertonie mit beginnender Herzinsuffizienz nicht zwangsweise zu einer Herztransplantation führen. Wesentlich schlechter diagnostisch zu erkennen und nicht immer ausreichend therapierbar sind langsam progrediente Schädigungen eines Organs, wie z.B. die diabetische Nephropathie. Es ist kein Zufall, dass viele Typ-I-Diabetiker zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr einen dialysepflichtigen Nierenschaden besitzen. Im Falle eines kompletten Organversagens kann nach dem heutigen Stand der medizinischen Möglichkeiten nur eine lebensrettende Organtransplantation (TX) Abhilfe schaffen. Das jährlich am häufigsten transplantierte Organ ist die Niere, wobei jedoch eine ansteigende

Divergenz zwischen den Zahlen der potentiellen Empfänger und der verfügbaren Organe zu verzeichnen ist (s. Abb.02) (*Persijn et al., 2001*).

Folgende Zahlen gelten für Deutschland in den Jahren 1998-2000:

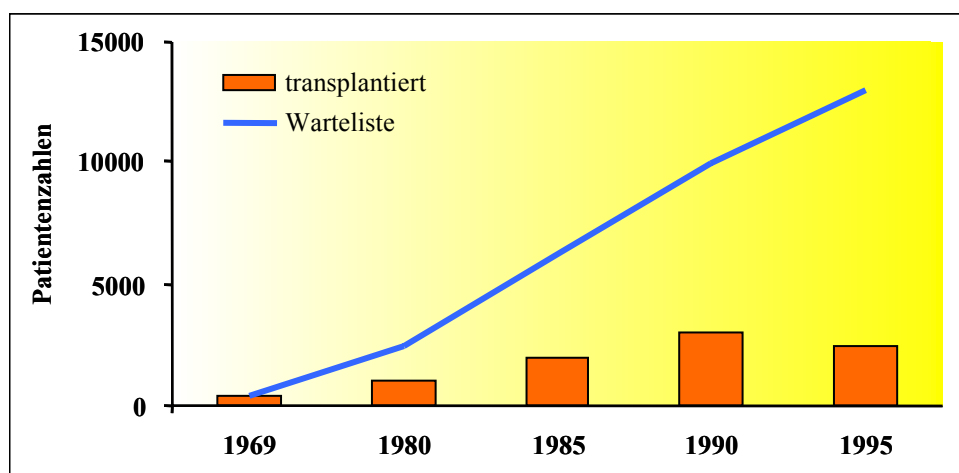
Jahr	Patientenzahl	Niere	Leber	Pankreas	Herz	Lunge
1998	Warteliste	9067	354	109	581	136
	Transplantiert*	1997	699	175	528	117
1999	Warteliste	9513	425	147	495	242
	Transplantiert*	1905	719	209	48	125
2000	Warteliste	9510	600	153	381	270
	Transplantiert*	1641	692	232	407	147

**Tab. 01** Entwicklung der Wartelisten auf verschiedene Organtransplantationen von 1998-2000 im Bereich von Eurotransplant (\* nur Leichenspende)

## 1.2 Nierentransplantation

Die häufigste Ursache für Nierenerkrankungen im Endstadium ist die bereits erwähnte diabetische Nephropathie, gefolgt von der Nephroangiosklerose bei hohem Blutdruck und verschiedenen primären und sekundären Glomerulopathien unterschiedlicher Genese (z.B. Analgetikanephropathie, Infektionen, Autoimmunerkrankungen). Die Nierentransplantation gilt heute als kostengünstigste und wirksamste Therapie der terminalen Niereninsuffizienz. Die Kosten hierfür belaufen sich einschließlich des stationären Aufenthalts auf ca. 50.000 €, des Weiteren entstehen in der Folgezeit je nach Gewebeverträglichkeit und Häufigkeit von Abstoßungsreaktionen Behandlungskosten von 7.000 € bis 10.000 € pro Jahr. Demgegenüber stehen die Kosten einer Dialysebehandlung von ca. 30.000 € bis 50.000 € pro Jahr (*Statistiken Eurotransplant, 2001; Kasiske et al. 2000*). Der jedoch wichtigste Parameter wird bei derartigen Vergleichen oft nicht berücksichtigt, der Gewinn an Lebensqualität nach der Transplantation.

Die erste erfolgreiche Nierentransplantation wurde im Jahre 1954 in Boston, USA an eineiigen Zwillingen durchgeführt (syngene Transplantation). Mit der Entwicklung der immunsuppressiven Medikamente war es möglich die Transplantationen mit wachsendem Erfolg auch zwischen genetisch verschiedenen Individuen der gleichen Art durchzuführen (Allotransplantation). Die Indikation zu einer Nierentransplantation besteht grundsätzlich bei der dialysepflichtigen terminalen Niereninsuffizienz, wobei wie oben bereits erwähnt, unterschiedliche Erkrankungen zugrunde liegen. Bei der chronischen Dialysebehandlung sind die erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität, aber auch arteriosklerotische Spätfolgen und Störungen im Knochenstoffwechsel zu bedenken. Des Weiteren muss unter der Dialysebehandlung der Ausfall der endokrinen Funktion der Nieren durch adäquate Hormonsubstitution kompensiert werden. Im Vordergrund stehen hierbei die Substitution des Erythropoetins



**Abb. 02** Entwicklung der Warteliste für eine Nierentransplantation im Bereich von Eurotransplant

(EPO → renale Anämie), der Mineralocorticoide und die Gabe von Calcium-Phosphat zusammen mit Vitamin D<sub>3</sub> zur Normalisierung des Knochenstoffwechsels. Bei Kindern kommt es zu einer deutlichen Wachstumsretardierung (renale Dystrophie). Im Falle einer diabetischen Nephropathie auf dem Boden eines schweren Diabetes mellitus ist auch die kombinierte Pankreas-Nierentransplantation in Erwägung zu ziehen (*Becker et al., 2001*). Folgende Grunderkrankungen sind die häufigsten Ursachen einer chronischen bzw. terminalen Niereninsuffizienz, die zu einer Nierenersatztherapie führen (Dialyse bzw. TX):

	Alter 15-64 Jahre (%)	Alter 65 Jahre und älter (%)
Glomerulonephritis	27	13
Interstitielle Nephritis	17	20
Zystennieren	7	4
Diabetes mellitus I / II	11	11
Hypertonie	8	16
übrige	16	15
unbekannt	14	21

**Tab. 02** Ätiologie der terminalen bzw. chronischen Niereninsuffizienz, Eurotransplant 2001

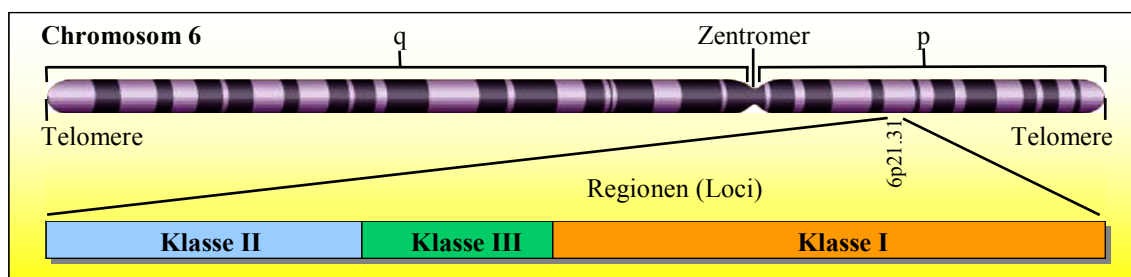
### 1.3 Transplantationsimmunologie

Die Zuteilung der Organe erfolgt hauptsächlich hinsichtlich der Blutgruppenidentität und der Kompatibilität der humanen Leukocyten Antigene (HLA) von Spender und Empfänger (*Eurotransplant, 2001; Burdick, 2001*). Obwohl eine größtmögliche Übereinstimmung angestrebt wird, liegt jedoch nur bei etwa 20% der Patienten eine vollständige Übereinstimmung der getesteten HLA-Antigene vor. Die Anzahl der inkompatiblen Antigene liegt i.d.R. aber unter 6. Angegeben wird die mangelnde Übereinstimmung als „Mismatch“ (MM) mit der Anzahl der nicht übereinstimmenden HLA; z.B. MM2. Bei Patienten mit einem seltenen HLA-Antigenmuster wird im allgemeinen nicht auf eine perfekt kompatible Niere gewartet. Hinsichtlich der Blutgruppenkompatibilität zwischen Spender und Empfänger bei einer Organ TX gelten dieselben Regeln wie bei einer Bluttransfusion, jedoch spielen die Rhesusfaktoren keine Rolle.

Spender	Empfänger
A	A oder AB
B	B oder AB
AB	AB
0	alle

**Tab. 03** Blutgruppenkompatibilität bei Organtransplantationen  
(*Burdick et al., 2001*)

Unter der Bezeichnung HLA versteht man die verschiedenen humanen Leukozyten Antigene, die von den MHC-Klasse I und Klasse II Genen kodiert werden. Zudem kodieren diese Gene für bestimmte Gewebean Antigene, gegen die sich die Immunabwehr des Empfängers richten kann. Der menschliche MHC ist auf dem Chromosom 6 lokalisiert. Dieser Abschnitt umfasst die Erbinformation der sog. humanen Leukozytenantigene (HLA), die wiederum in vier Gen-Blöcken auf dem HLA-Gen-Locus unterteilt sind (*Mackay, 2000*):



**Abb. 03** Lokalisation des HLA- Komplexes auf Chromosom 6

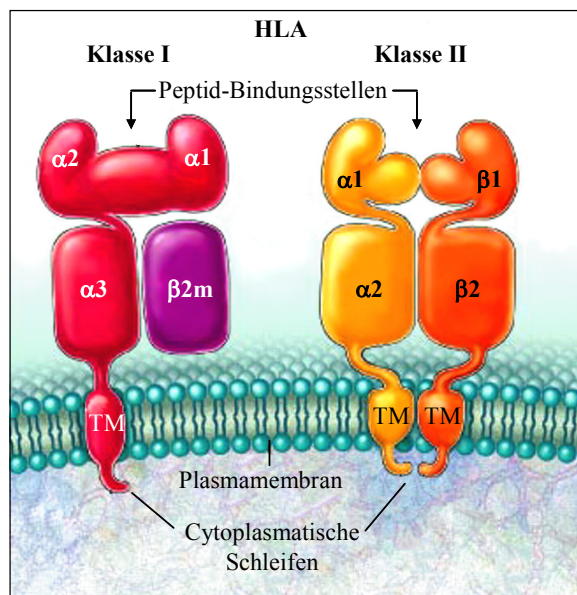
Die „klassischen“ HLA-Antigene bezeichnet man heute genauer als HLA-Klasse-I-Antigene. Diese sind heterodimere Ketten, die sich aus einer  $\alpha$ -Kette und dem damit assoziierten  $\beta_2$ -Mikroglobulin zusammensetzen. Die  $\alpha$ -Ketten bestehen wiederum aus drei Untereinheiten und werden durch A-, B-, C- Regionen des MHC-Klasse-I-Gens auf Chromosom 6 kodiert (HLA-A, HLA-B, HLA-C). Im Gegensatz zu den monomorphen  $\beta_2$ -Mikroglobulin sind die  $\alpha$ -Ketten polymorph (*Natarajan, 1999*).

Das MHC-Klasse-II-Gen kodiert für HLA-Klasse-II-Antigene, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ - Kette bestehen, die wiederum in je zwei Untereinheiten gegliedert sind. Man bezeichnet diesen Genabschnitt in Anlehnung an die Unterteilung MHC-Klasse-I-Gen als HLA-D Abschnitt. Diese HLA-D-Region spaltet sich in die drei Unterregionen auf (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) (*Little, 1999*). Nach Vorliegen der HLA-Typisierung des Spenders durch Überprüfung dieser 6 HLA wird die Niere nach Kriterien der Blutgruppenidentität sowie bestmöglicher HLA-Kompatibilität (HLA-Matching) den Patienten auf der Warteliste zugeteilt.

<b>MHC-Klasse-I-Gene</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert</li> <li>- wichtig für die Antigenerkennung durch zytotoxische T-Zellen</li> </ul>
<b>MHC-Klasse-II-Gene</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- beschränkte Gewebeverteilung; auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert</li> <li>- wichtig für Antigenerkennung durch T-Helferzellen</li> </ul>
<b>MHC-Klasse-III-Gene</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- umfassen u.a. viele Komplementkomponenten</li> <li>- kodieren für Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)</li> </ul>
<b>MHC-Klasse-IV-Gene</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- kodieren für Moleküle, die den Klasse-I-Antigenen ähneln</li> <li>- wirken vermutlich als Differenzierungsantigene bei der Entwicklung</li> </ul>

**Tab. 04** Differenzierung der MHC- Gene

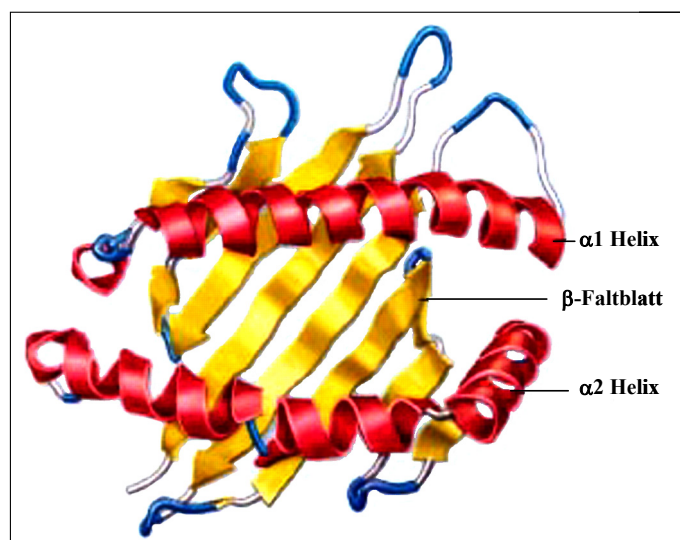
Die gesamte MHC-Region auf dem Chromosom 6 wird normalerweise zusammen weitervererbt. Somit wird der MHC aus den beiden Haplotypen der Eltern gebildet, die entsprechenden HLA beider Haplotypen werden auf den Zelloberflächen exprimiert. In unterschiedlichen Populationen variiert die Häufigkeit bestimmter Allele in großem Maße, so dass bestimmte HLA-Typen besonders häufig auftreten können, andere wiederum sehr selten zu finden sind. Neben der Bedeutung der bei Transplantatabstoßungsreaktionen spielen bestimmte HLA auch bei Autoimmunerkrankungen eine Rolle, so z.B. bei rheumatoider Arthritis oder Myasthenia gravis. Unterscheiden sich HLA-Typ des Spenders und des Empfängers, bedeutet dies, dass an den Zelloberflächen des Transplantats MHC-Strukturen vom Immunsystem des Empfängers als „fremd“ eingestuft werden und folglich attackiert werden. Je größer die Unterschiede des HLA-Typs von Spender und Empfänger sind, desto wahrscheinlicher wird eine Abstoßungsreaktion (*Mackay et al., 2000*).



**Abb.04** Darstellung der HLA I und II Antigenen auf einer Zelloberfläche (vgl. Tab. 04)

Erstaunlich ist auch, dass nicht alle HLA-Subtypen eine gleich intensive Immunreaktion beim Empfänger hervorrufen, so ist z.B. bei einer HLA-B und zugleich HLA-DR Übereinstimmung eine signifikant bessere Transplantatüberlebensrate zu erwarten, als bei Gleichheit anderer HLA. Besondere Erwähnung verdienen die löslichen Klasse I Antigene (sHLA I) im menschlichen Serum auch in anderen Körperflüssigkeiten (Urin, Speichel, Schweiß, Liquor cerebrospinalis). Ihre Rolle bei vielen Autoimmunerkrankungen ist noch nicht geklärt, jedoch im Bezug auf die Transplantationsimmunologie muss man sie als ein zweischneidiges Schwert betrachten. Nach erfolgter Organtransplantation werden deutlich erhöhte

Spiegel des sHLA I in Plasma und im Transplantat festgestellt. Einerseits sind die sHLA I in der Lage die Immunabwehr zu induzieren, andererseits aber auch eine Immuntoleranz zu bewirken (*Abdelnoor, 2001*). So konnte gezeigt werden, dass bei Hauttransplantationen nach vorausgegangener Injektion des Spender sHLA I Komplexes die Transplantatüberlebensrate deutlich erhöht werden konnte. Jedoch werden diese Regulationsmechanismen noch nicht ausreichend verstanden um daraus Konsequenzen für die Transplantation abzuleiten



**Abb. 05** Ribbon Modell der Tertiärstruktur der Peptidbindungsstelle eines HLA I Moleküls. (*Little, 1999*). (vgl. Abb.04)

## 1.4 Herkunft und Verteilung der Organe, Transplantationsgesetz (TPG)

Die Spenderorgane stammen zu über 95% von hirntoten Spendern (Leichenspende = cadaveric graft). Das Verfahren der Feststellung des Hirntodes wurde 1968 von einer Arbeitsgruppe der Harvard Medical School, USA entwickelt und löste die bis dahin übliche Definition des Coma dépassé (irreversibles Koma) ab (*Taylor, 1997*). Seither ist dieses Verfahren einer der größten Kritikpunkte der Transplantationsmedizin und sorgt zudem immer wieder für Horrorgeschichten in der Bevölkerung. Geschürt wird die Diskussion um diese Diagnose leider durch mehrere Fälle, bei denen bereits zur Organentnahme freigegebene „Hirntote“ wieder das Bewusstsein erlangten. Nach Feststellung des Hirntodes durch zwei unabhängige Ärzte sorgt man beim Spender für stabile Kreislaufbedingungen und eine normale Nierenfunktion. Anschließend können die Nieren entfernt, gespült, durch Perfusion gekühlt und in speziellen gepufferten Kühllösungen bei 4°C zur Vorbereitung auf den Transport konserviert werden. Bewährte Pufferlösungen sind u.a. die „University-of-Wisconsin-Solution“ (UW Lösung) und die „Celsior Solution“. Diese Lösungen enthalten verschiedene Elektrolyte, Kohlenhydrate und Antioxidantien, sind gewebe-isotonisch (320 mOsmol/kg) und –isohydrisch (pH 7,3). Es gibt viele klinische und tierexperimentelle Untersuchungen zu den Auswirkungen bei der Verwendung bestimmter Konservierungslösungen im Hinblick auf Freisetzung von Mediatoren (Interleukine, Interferone, NO etc.) und Auswirkungen auf die Transplantatüberlebensrate bzw. unmittelbare Transplantatfunktion (*Wildhirt et al., 2000*). Nieren sollten nicht länger als 36 Stunden gelagert werden, diese können dennoch verwendet werden, wenn die Organe kontinuierlich mit einer Sauerstoff angereicherten Plasmalösung perfundiert wurden.

Die Alternative zur Leichenspende ist die Nierenlebendspende von Nicht-Blutsverwandten (LURD: living unrelated donors), sowie von Angehörigen der Nierenkranken (LRD: living related donors) (*UNOS, 2001; DSO, 2001*). Die Vorteile dieser Art der Organspende liegen klar auf der Hand: Organentnahme und TX können zeitlich optimal aufeinander abgestimmt bzw. geplant werden und im günstigsten Fall sogar in derselben Klinik vorgenommen werden. Die Risiken die der Organspender hierbei eingeht sind relativ gering und die möglichen Komplikationen nach der Entnahme sind allgemeiner Natur (z.B. Wundschmerz, Infektionen, Blutungen etc.), wobei die Mortalität unter 0,05 % liegt. Die Anwendung minimal invasiver OP Methoden bei der Nephrektomie minimieren das Risiko für den Spender zusätzlich. Im Angehörigenbereich ist eine steigende Zahl von Organspenden zu verzeichnen, wogegen die Spende von LURDs noch eine untergeordnete Rolle spielt. Erfreulich ist zu diesem Thema auch das Ergebnis der jüngsten FORSA-Umfrage vom 24.01.2002 laut der 72% der Deutschen grundsätzlich zu einer Organspende bereit sind und 98% ein fremdes Organ annehmen würden. Absolute Ausschlußkriterien für eine Organspende, sei es von einem lebenden oder hirntoten Spender sind akute maligne Tumorerkrankungen, HIV-Infektionen sowie eine Sepsis mit Keimnachweis im Blut. Hingegen sind Malignome in jüngerer Vergangenheit (ohne ein tumorfreies Intervall von mind. 2 Jahren), chronische Infektionen, HIV-Infektionen und schwere psychische Erkrankungen eine Kontraindikation für den Empfänger zur Nierentransplantation.



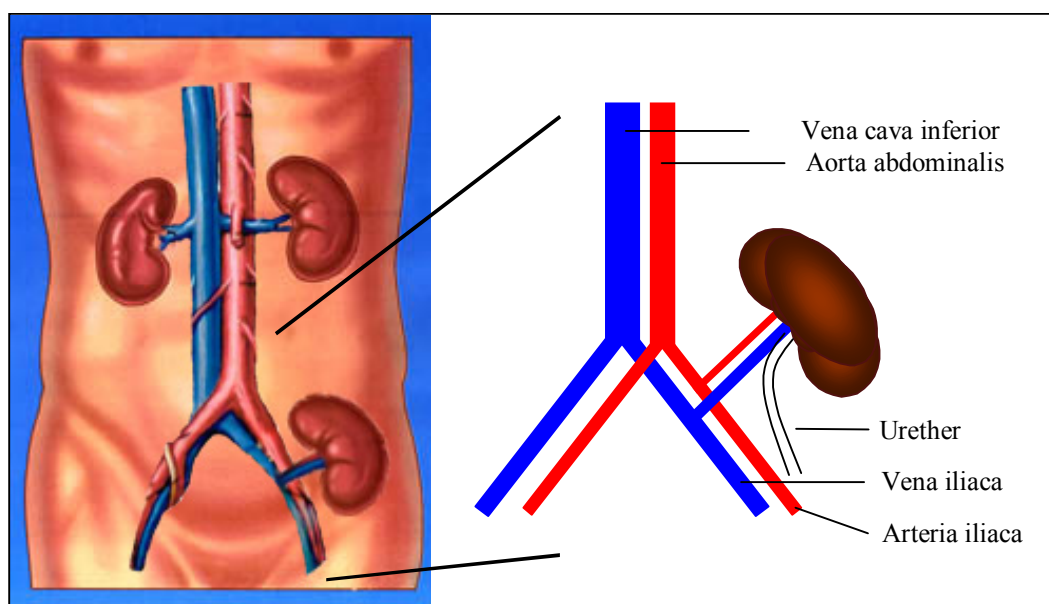
## **Das Transplantationsgesetz (TPG) und die Verteilung der Organe**

Die gesetzliche Grundlage für die Spende, Entnahme und Übertragung von menschlichen Organen ist das TPG vom 5. November 1997 (*BGBL.I S.2631*). Das Gesetz legt fest, daß der kommerzielle Handel von menschlichen Organen verboten ist (§§1, 17, 18). Weiterhin dürfen Organe zur Lebendspende nur an Verwandte 1. oder 2. Grades (LRD) oder „offenkundig nahe stehende Personen“ (LURD) gespendet werden (§8). Wichtig ist darauf hinzuweisen, dass es sich im Falle der LURD um eine Organ-„Spende“ handelt, für die der Spender nicht bezahlt werden darf. Eine Grauzone stellen die sog. Über-Kreuz-Lebendspenden (Cross- over-Spenden) von gleichbetroffenen Paaren dar, wobei sozusagen im Tauschwege jeweils der gesunde Partner dem nierenkranken Partner des anderen Paares eine Niere spendet. Da sich die Paare nur zu dem Zwecke der TX kennen lernen gerät man in Konflikt mit dem §8 (s.o.). Weitere Kernpunkte des Gesetzes sind die Aufklärung der Bevölkerung über die Möglichkeiten der Organspende und die strikte Trennung von Verantwortlichkeiten bei der Organentnahme und der Organvermittlung. Im Europarat wird durch den Lenkungsausschuss für Bioethik momentan an einem einheitlichen Gesetzesentwurf gearbeitet.

Die Koordinierungsstelle für OrganTX in Deutschland ist die DSO (Dt. Stiftung für OrganTX) in Neu-Isenburg, die Vermittlung der Organe erfolgt über die Eurotransplant Zentrale in Leiden, NL für Deutschland, Österreich und die Benelux Staaten. Das amerikanische Pendant ist die UNOS (United Network for Organ Sharing). Hier werden mit dem Computerprogramm X-COMB (nur bei Nieren-TX) Übereinstimmungen mit den Spender- und Empfängerdaten hinsichtlich des HLA-Matches, der Wartezeit und des potentiellen Transportweges der Organe ermittelt. Der Patient wird dann von dem entsprechenden Zentrum zur Transplantation einbestellt und es beginnt unmittelbar die allgemeine und spezielle OP Vorbereitung. Im Mittel liegt die Wartezeit auf ein Spenderorgan bei 4 Jahren, so dass verschiedene Vorsorgeuntersuchungen beim Empfänger regelmäßig wiederholt werden müssen. Die Verteilung der verfügbaren Spenderorgane ausschließlich nach HLA-Kompatibilität ist allerdings umstritten. Obgleich große Studien eine bessere Prognose im Langzeit-Verlauf nach Nierentransplantation bei guter Übereinstimmung der HLA-Muster zwischen Spender und Empfänger zeigen konnten, sind diese Unterschiede bei den heute verfügbaren Immunsuppressiva doch relativ gering. Gute Ergebnisse können auch bei komplett HLA inkompatiblen, lediglich blutgruppenidentischen Transplantaten erreicht werden

### **1.5 Durchführung der Operation und Prognose**

Wurde der Patient zur Nierentransplantation einbestellt erfolgen zunächst umfangreiche Voruntersuchungen bis die eigentliche Nierentransplantation beginnt. Im Sinne einer Minimierung der Ischämiezeit wird die Transplantation so schnell wie möglich vorgenommen. Es wird grundsätzlich nur eine Niere verpflanzt, da sie zur Aufrechterhaltung der Nierenfunktion völlig ausreichend ist. Bis auf wenige Ausnahmen (Infektionen der Nieren, Zystennieren) werden die eigenen Nieren im Körper belassen (*Morris, 2001*).



**Abb. 06** Darstellung der heterotopen NierenTX in die Fossa iliaca

Je nach Verhältnisse dauert die Operation 2- 4 Stunden, wobei die Transplantation der Niere in der Regel heterotop in die Fossa iliaca (Beckenschaufel) erfolgt. Die A.renalis wird end-to-side mit der empfängerseitigen A.iliaca communis (Beckenarterie) anastomosiert, die V.renalis end-to-side mit der V.iliaca externa (Beckenvene) (*Shapiro, 1998*). Der Ureter wird im Sinne einer Ureterneozystostomie direkt in die Harnblase eingepflanzt, wobei die Anastomosierung mit der Blasenschleimhaut erfolgt. Es wird eine Antirefluxplastik nach Gregoire angelegt, um hierdurch Harnwegsinfekte zu vermeiden. Bei verschiedenen Vorerkrankungen müssen dem Empfänger möglicherweise die Eigennieren entfernt werden. Dies ist z.B. der Fall bei der Analgetikanephropathie, da hier die Gefahr einer malignen Entartung des Urothels beträchtlich ist und die Diagnosestellung eines Urothel-Carcinoms bei Oligo- oder gar Anurie erst sehr spät möglich ist. Weiterhin wird man eine beidseitige Nephrektomie bei polyzystischen Nierenerkrankungen aber auch bei Infektionen und Einblutungen in Zysten in Erwägung ziehen (*Morris, 2001*).

Postoperativ ist auf eine ausreichende Diurese zu achten, evtl. muss ein i.v. Bolus von bis zu 80mg Furosemid gegeben werden. Grundsätzlich wird unmittelbar nach jeder Nierentransplantation eine Farbdopplersonographie der Transplantatgefäße durchgeführt. Ausgeschlossen werden muss v.a. eine venöse Thrombose, ein Abflusshindernis sowie ein Urinleck. Bei unkompliziertem Verlauf dauert der stationäre Aufenthalt ca. 3-4 Wochen, danach erfolgt die Nachsorge ambulant in immer größer werdenden Abständen in den Transplantationszentren. Die immunsuppressive Medikation wird nach einem standardisierten Schema festgelegt, auf das später noch genauer eingegangen wird. Das Patientenüberleben ein Jahr nach Nierentransplantation liegt bei ca. 95% und entspricht damit im wesentlichen der Lebenserwartung an der Dialyse, wobei das Transplantatüberleben ganz entscheidend durch das immunologische Risiko des Empfängers beeinflusst wird. Hierbei ist ein wichtiger Parameter der Nachweis alloreaktiver cytotoxischer Antikörper im Serum des Empfängers. Diese Antikörper

können sich auch durch Schwangerschaften, Bluttransfusionen und im Rahmen vorausgegangener Organtransplantationen entwickeln. Nach der Transplantation beträgt das 1-Jahres-Transplantatüberleben bei nicht-immunisierten Patienten inzwischen bis zu 90%, nach 5 Jahren arbeiten noch ca. 65 – 70% und nach 10 Jahren noch ca. 50% der Transplantatnieren (*Eurotransplant, 2001*). Im Mittel gehen also nach dem ersten Jahr pro Jahr ca. 6% der Nieren verloren. Die Ursachen hierfür sind u.a. chronische Dysfunktionen und chronische Abstoßungsprozesse, aber auch Rezidive der Grundkrankheit und eine chronische Toxizität des CsA. Eine besondere Rolle scheint der arteriellen Hypertonie zu zukommen, da Patienten mit Hypertonus häufiger eine chronische Transplantatdysfunktion erleiden als Normotoniker. Bei einer erneuten TX ist das Transplantatüberleben aufgrund eines erhöhten immunologischen Risikos durch das oben angesprochene Problem alloreaktiver Antikörper etwas schlechter. Das 1-Jahres-Transplantatüberleben beträgt hierbei etwa 80 %, nach der 3. Transplantation ca. 70%.

## 1.6 Immunsuppressive Therapie und das Drug Monitoring

Um die immunologischen Abstoßungsmechanismen bestmöglich zu unterdrücken sind ausgeklügelte Medikationsschemata, sowie ein lückenloses „Therapeutisches Drug-Monitoring“ (TDM) unbedingt erforderlich. Man beginnt 6 Stunden post-operativ mit der Gabe von Cyclosporin, und zwar 7-10 [mg/kg\*d] p.o. z.B. Sandimmun Optoral® auf 2 Tagesdosen verteilt, in den USA gibt es ein Therapieschema mit präoperativer CsA Gabe. Immunisierte Patienten erhalten eine etwas höhere Dosis, 10 [mg/kg\*d] p.o. Zusätzlich bekommen die Patienten 2[g/d] Mycophenolat-mofetil (Cellcept®) und 250 [mg/d] Methylprednisolon (Urbason®), dessen Dosis dann am 2.Tag auf 100 [mg/d] reduziert und am 3. Tag durch Prednisolon (Decortin®) ersetzt wird (*Land, 2001*). Immunisierte Patienten erhalten wiederum eine etwas höhere Dosis an Glucocorticoiden. Nach Erreichen der Ziel-Tal-Spiegel des CsA (160-180 [ng/ml]) kann die Dosis auf 5-7 [mg/kg\*d] reduziert werden. Bei einigen Patienten, sowie bei Kindern, die infolge ihres kleineren Intestinums auch zur Malabsorbergruppe zu zählen sind, kann es z.B. nach LeberTX nötig sein die Initialdosen parenteral zu geben. Wie bei keinem anderen Arzneistoff stand das TDM des CsA in den letzten Jahren in der klinischen Diskussion (*Benet, 1999; Barone, 1996; Belitsky et al., 2000; Marsh, 1999; Meier-Kriesche, 1998*). Die großen inter- und intraindividuellen Schwankungen der Bioverfügbarkeit sind die Gründe für eine individuelle pharmakokinetische Überwachung. Da es sowohl aus Kostengründen als auch wegen der nicht zumutbaren Belastung für den Patienten, nicht möglich ist eine komplette Pharmakokinetik zu bestimmen, muss nach geeigneten Parametern für die CsA Bioverfügbarkeit gesucht werden (*Cole, 2000; Lundgren 1986; Noble, 1995*). Klinisch verbreitet ist die Bestimmung der trough-Spiegel (Talspiegel) eines Arzneistoffs im Plasma im steady-state unmittelbar vor der nächsten Gabe. Man bezeichnet diesen Wert auch als C<sub>0</sub>-Wert. Viele groß angelegte Studien zeigten jedoch, dass der Talspiegel oft sehr schlecht die Schwankungen der CsA Bioverfügbarkeit wiedergibt, zumal die Gewebespiegel ca. zehnfach höher liegen, bei einer sehr raschen Umverteilung aus dem Plasma in das Gewebe. Obwohl bei vielen Patienten die Tal-Spiegel im Normbereich waren (160-180 [ng/ml]) zeigten sie Abstoßungsreaktionen

(Frei, 1999). Es wurden einige alternative Vorschläge zur  $C_0$ -Bestimmung gemacht, u.a. eine „Hochrechnung“ der AUC mittels einer 3-Punkt-Messung 1, 2 und 5 h nach Gabe, wogegen jedoch viel für eine Gehaltsbestimmung nach 2h ( $C_2$ -Methode) spricht (Cantarovich, 1998; Helderma, 1999; Levy, 2001). Der Grund dafür ist, dass das  $t_{\max}$  des Sandimmun Optoral® bei 2h liegt. Man analysiert somit die maximale Plasmakonzentration  $c_{\max}$ , die viel aussagekräftiger das Ausmaß der Bioverfügbarkeit widerspiegelt als der Talspiegel, jedoch dürfte es schwierig sein ein derartiges Konzept im klinischen Alltag zu verwirklichen.

## **1.7 Pharmakologie und Galenik des CsA**

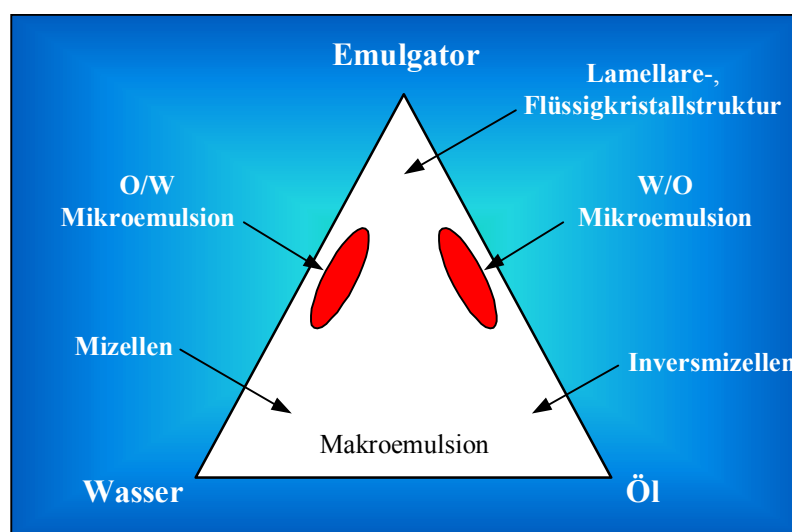
### **1.7.1 Bioverfügbarkeit**

#### **Historische Anmerkungen**

Im Jahre 1970 wurde in einer Erdprobe der Hardanger-Vidda Hochebene in Norwegen ein neuer Pilzstamm aus der Gruppe der Fungi imperfecti entdeckt. Er erhielt den Namen *Tolycopladium inflatum* Gams und wurde in den Laboren der Sandoz AG, Basel untersucht. Es wurden mehrere pharmakologisch interessante Verbindungen daraus isoliert, u.a. das CsA. Der geplante Einsatz als Antimykotikum wurde revidiert, nachdem man im Tierversuch eine starke immunsuppressive Wirkung festgestellt hatte. Ein semisynthetisches Präparat konnte trotz vielfacher Anstrengungen aufgrund der starken Abhängigkeit der immunsuppressiven Aktivität der Substanz von der stereochemischen Struktur bis heute nicht hergestellt werden. Das CsA als Reinsubstanz ist hochlipophil und ist in dieser Form nach oraler Gabe nicht resorbierbar. Das erste auf dem Markt verfügbare Präparat Sandimmun®, Sandoz AG, enthielt das CsA gelöst in einer Mischung aus Ethanol und Olivenöl. Die Einführung des Präparates vor etwa 20 Jahren revolutionierte die Transplantationsmedizin, doch zeigte sich bald, dass das CsA einer hohen inter- sowie intraindividuelle Schwankung der Bioverfügbarkeit unterliegt (Amante, 1997; Brone, 1996). Insbesondere bei Lebertransplantaten wurde eine im Vergleich zu anderen transplantierten Organen eine deutlich höhere Abstoßungsrate verzeichnet. Die hohen Schwankungen der Bioverfügbarkeit hatten verschiedene Ursachen: Zum einen unterlag die inkorporierte Dosis im Gastrointestinaltrakt dem Angriff von Proteasen, zum anderen ist für die Resorption aus der Lipidphase eine gute Dispersion erforderlich. Diese wurde von Gallensalzen bewerkstelligt, die aber gleichzeitig auch Präzipitate von Fettsäuresalzen und CsA verursachten und somit die Resorption für einen erheblichen Teil verhinderten. Es ist offensichtlich, dass die Resorption damit ebenfalls starken Schwankungen unterliegt, da sie vom Gallenfluss, von der Anwesenheit von Nahrungsbestandteilen, der Darmmotilität etc. abhängt. Dies erklärt auch die schlechte Resorption bei Lebertransplantatierten (Arumugam, 1998; Belli, 1994), die bis zu mehreren Wochen nach der Operation einen verminderten Gallenfluß besitzen oder sogar eine Gallengangdrainage besitzen. Um die orale Bioverfügbarkeit des CsA zu verbessern konzentrierte sich die pharmazeutisch-technologische Forschung in den folgenden Jahren auf die Entwicklung einer „Mikroemulsion“ als Trägersystem.

### 1.7.2 Technologie der Mikroemulsion

Der Begriff der Mikroemulsion wurde bereits 1940 von Hoar und Schulman geprägt, die eine milchige Emulsion mit Hexanol titrierten bis sie schließlich eine klare einphasige Lösung erhielten. Thermodynamisch betrachtet besteht zwischen einer Emulsion und einer Mikroemulsion ein großer Unterschied. Eine Emulsion ist ein 2 Phasensystem (OW oder WO) mit einer Phase im Überschuss (= Außenphase), wobei der Tyndalleffekt durch die feine Dispersion der Innenphase hervorgerufen wird. Durch die starke Entropiezunahme ist eine Emulsion thermodynamisch sehr instabil und erleidet nach mehr oder weniger langer Zeit eine Phasenseparation. Eine Mikroemulsion hingegen ist ein 1 Phasensystem, zwar auch aus hydrophilen, lipophilen und amphiphilen Bestandteilen, aber bei ganz bestimmten Konzentrationsverhältnissen dieser 3



**Abb. 07** Pseudo-ternäres Phasendiagramm zur schematischen Darstellung der Phasenverteilung einer Emulsion

Komponenten verschwindet die Phasengrenze und es entsteht eine optisch völlig transparente Lösung, die thermodynamisch stabil ist und eine gelartige Konsistenz aufweist („swinging gels“). Differenzieren davon muss man sehr feine hochdisperse Emulsionen, die aufgrund der Tröpfchengrößen der Innenphase unterhalb der Wellenlänge des sichtbaren Lichtes ( $< 400 \text{ nm}$ ) auch beinahe transparent sind. Sowohl lipophile als auch hydrophile Substanzen können in einer Mikroemulsion sehr gut dispergiert werden, bei gleichzeitiger ausgezeichneter Stabilität. Jedoch wird der Begriff der Mikroemulsion oftmals missinterpretiert, so im Falle der „self-(micro-)emulsifying-drug-delivery-systems“ (S(M)EDDS) (Bagwe, 2001; Tenjarla, 1999). Diese Formulierungen besitzen einen sehr hohen Emulgatoranteil und sind beinahe wasserfrei. Erst nach Inkorporation z.B. als Weichgelatine Kapsel, formt sich daraus unmittelbar nach Kontakt mit der wässrigen gastrointestinalen Flüssigkeit eine sehr feine Emulsion unter Phaseninversion mit guter Stabilität. Der prominenteste Vertreter dieser Klasse ist das CsA Medikament Sandimmun Neoral<sup>®</sup> (=Sandimmun Optoral<sup>®</sup>), Novartis Pharma.

Es ist deswegen keine echte Mikroemulsion, da diese nur in einem ganz engen Konzentrationsfenster der 3 Komponenten existiert (s. Abb. 07). Durch ausgeklügelte Kombination der Bestandteile z.B. verschieden lange Triglyceridketten, bestimmte Emulgatoren wird zudem die Resorption erleichtert und in gewissem Maße ein Schutz gegen abbauende Enzyme im Verdauungssaft aufgebaut. Im Falle des CsA führte diese Galenik zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit und geringeren Schwankungen der Bioverfügbarkeit (Kahan, 1994; Keown, 1996; , da die Resorption nicht mehr von der Fähigkeit zur Emulgierung oder von gleichzeitig vorhandenen Nahrungsbestandteilen im Gastrointestinaltrakt abhängt. Somit können auch bei lebertransplantierten Patienten ausreichende Wirkstoffspiegel erreicht werden. Ein Vergleich pharmakokinetischer Parameter von Sandimmun® und Sandimmun Optoral® ist in Tab.05 dargestellt, mit deutlich verbesserten Werten für die „Mikroemulsion“.

PARAMETER	SANDIMMUN®	SANDIMMUN NEORAL®
T <sub>max</sub> [h]	3,5	1,5
C <sub>max</sub> [µg/l]	528	997
C <sub>min</sub> [µg/l]	92	94
AUC [µg*h/l]	2432	3454
PTF [%]	212	317

**Tab. 05** Pharmakokinetische Parameter (Browne, 1994), PTF: peak-to-trough-fluctuation

### 1.7.3. Pharmakodynamik

Das Immunsuppressivum CsA gehört wie das Makrolid Tacrolimus (FK506) zur Klasse der Calcineurin (CaN) Inhibitoren (s. Abb. 08). Dieses an der endofacialen Seite im Cytoplasma lokalisierte Enzym katalysiert u.a. einen essentiellen Schritt in der Regulation der Interleukin-2 Genexpression (Lorber, 1989). CsA bindet an eines der sog. immunkompetenten Proteine im Cytoplasma (Immunophiline), das Cyclophilin A (CypA) (Chaudhuri1, 1995; Chaudhuri2, 1995). Zur Bindung von CsA an Cyclophilin sind die Aminosäuren 1, 2, 10, 11 des CsA Moleküls essentiell. Die Cyclophiline katalysieren cis/trans Umlagerungen von Peptidyl-Prolyl-Bindungen, weswegen man sie auch als Rotamasen bezeichnet. In vivo sind unter CsA Therapie nur ca. 1-2% des Cyp A besetzt, was bedeutet, daß die Hemmung der Isomeraseaktivität einen untergeordneten Effekt darstellt. Dieser binäre Komplex kann sich nun an das durch Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin (CaM) aktivierte Enzym CaN anlagern und einen ternären Komplex bilden, der nicht mehr in der Lage ist den ebenfalls im Cytosol vorhandenen Transkriptionsfaktor NF-ATc, der ein Substrat darstellt, zu binden und zu dephosphorylieren (Clipstone 1993; Fruman, 1992 Liu, 1991). NF-ATc kann dadurch nicht mehr mit der nukleären Komponente des NF-AT, dem NF-ATn, verbinden, da die nukleäre Translokation unterbleibt. Das oktameren-aktivierende Protein (OAP), das ebenfalls ein Substrat des CaN ist, kann ebenfalls nicht translociert werden. In der Folge bleibt die Aktivierung der

Gentranskription v.a. des IL-2, -3, -4 sowie des GM-CSF, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  aus (Elliott, 1984), somit wird der T-zellrezeptoraktivierte Signaltransduktionsweg gehemmt. Die Folgen sind eine konzentrationsabhängige Hemmung der T-Zellproliferation und der Ausreifung antigenspezifischer cytotoxischer T-Lymphocyten. Weiterhin wird dadurch indirekt die von T-Zellen abhängige Freisetzung von IL-1 aus Makrophagen blockiert, die humorale Abwehr bleibt davon unberührt. Sind bereits manifeste Abstoßungsreaktionen im Gange, so ist die Wirkung des CsA stark eingeschränkt. Aufgrund dieser selektiven Hemmung der T-zellvermittelten Immunantwort wird das CsA auch erfolgreich bei Graft-versus-Host-Reaktionen nach Knochenmarkstransplantation und bei schweren Formen der Psoriasis und rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Einen beinahe identischen Wirkmechanismus besitzt das Makrolid Tacrolimus, welches aber im Gegensatz zum CsA, im Cytosol an FKBP bindet und danach das CaN hemmt.

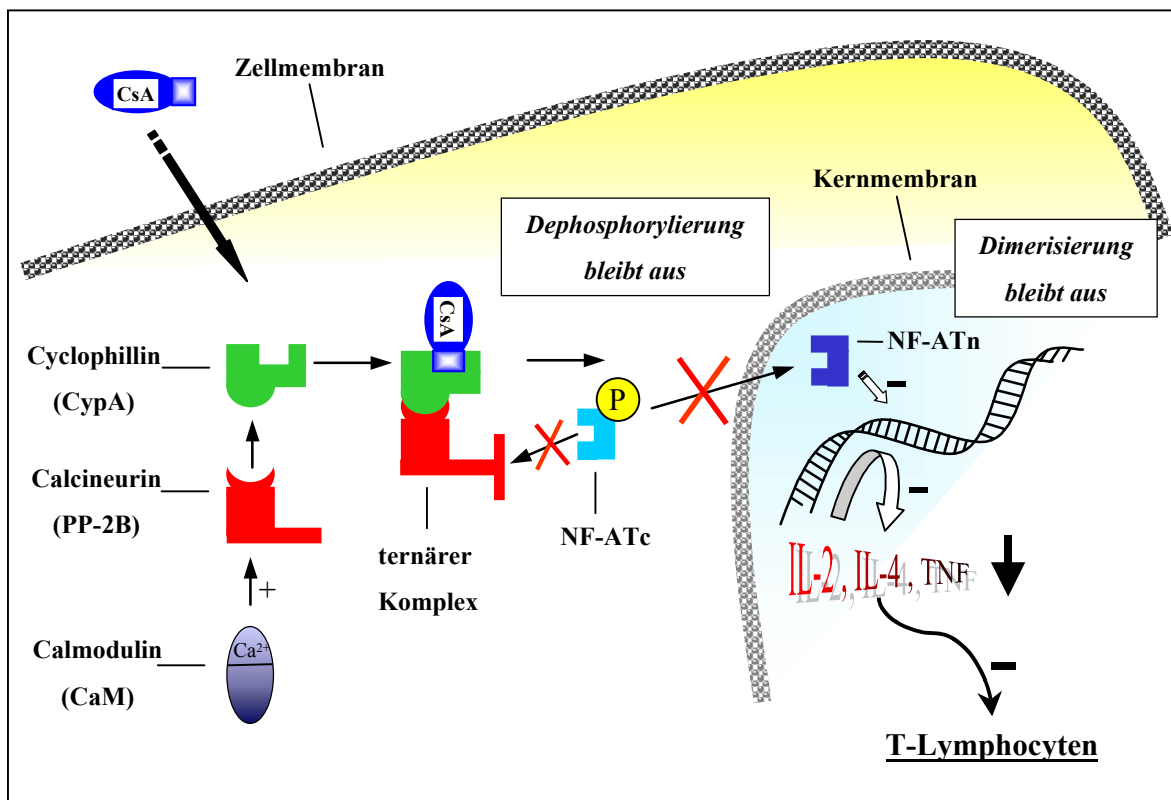


Abb. 08 Molekularer Wirkmechanismus des Cyclosporin A

### 1.7.4 Unerwünschte Wirkungen

Aufgrund des vorrangigen Einsatzgebietes des CsA als Immunsuppressivum nach Organtransplantationen, ist es als Langzeitpharmakon zu betrachten und man muss den unerwünschten Wirkungen des Pharmakons eine besondere Beachtung schenken. Die Nebenwirkungen sind breit gestreut, wobei die Nephrotoxizität, die Hypertonie und eine bisweilen auftretende Hepathopathie und Neurotoxizität die größte klinische Bedeutung

besitzen. Neben der Nephrotoxizität, der Hypertonie und der Hepathopathie kann man die restlichen Nebenwirkungen den großen intraindividuellen Schwankungen in der Bioverfügbarkeit zuordnen mit zeitweise auftretenden sehr hohen Wirkstoffspiegeln. Als weitere unangenehme Begleiterscheinungen sind gastrointestinale Beschwerden, Hypertrichose und die Gingivahyperplasie anzuführen. Eine gehäufte Inzidenz von Infekten, die bei einer starken Immunsuppression denkbar wäre, tritt unter CsA nicht auf. Hingegen ist die Zahl maligner Tumoren, v.a. von möglicherweise viral bedingten Lymphomen, bei hoher Dosierung leicht erhöht.

## **Hypertonie**

Ein hoher Blutdruck ist bei etwa 60-70% aller mit CsA (*Haas, 1997*) behandelten Patienten zu verzeichnen, wobei das zuvor zugrundeliegende Krankheitsbild eine große Rolle spielt. In Akutversuchen an Ratten, denen eine CsA Formulierung bei gleichzeitiger intraarterieller Blutdruckmessung i.v. verabreicht wurde, zeigte sich eine sofortige Blutdrucksteigerung, die über eine halbe Stunde anhielt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß zumindest für einen Teil dieser akuten Blutdruckerhöhung ein Emulgator, Chremophor EL (poly-oxyethylenisiertes Rizinusöl), verantwortlich gemacht werden kann.

Die Hypertonie manifestiert sich mehrere Monaten nach der Transplantation und ist als ernstzunehmende Komplikation zu betrachten (*Cifkova, 2001*), der ggf. mit Antihypertensiva begegnet werden muss. Die Ursachen sind noch nicht vollständig geklärt, fest steht jedoch, dass in der Frühphase der Hypertonie ein erhöhter Sympathikustonus nachgewiesen werden kann (*Grobecker et al., 1995, Scherrer et al., 1990*) und sich im Laufe von Wochen und Monaten eine renale Vasokonstriktion einstellt (*Radermacher, 1998*). Offensichtlich sind neben dem sympatho-adrenalen System (SAS) auch andere pressorische Systeme wie das Endothelinsystem (ETS) (*Cairns, 1988*) beteiligt. Das Renin-Angiotensin System (RAS) scheint hierbei eine untergeordnete Rolle zu spielen (*Farge et al., 1998; Rettig et al., 1994*). Ein in diesem Zusammenhang wichtiger Aspekt ist die erhöhte Neurotransmitterfreisetzung (z.B. von Noradrenalin) unter CaN-Blockade (*Kopsa, 1989*).

## **Nephrotoxizität**

Ein lückenloseres TDM hat dazugeführt die Nephrotoxizität des CsA zu reduzieren, jedoch treten immer wieder gravierende Schädigungen auf (*Banfi, 1987; Carmellini, 1990; Dieperkink, 1987; Dieperkink, 1989*). Die Ursachen für die Mikrokalzifikationen und interstitiellen Nephritiden sind noch nicht aufgeklärt (*D'Agati, 1995*), jedoch nimmt man an, dass durch die CaN Blockade das komplexe Autoregulationsystem der Niere gestört wird. Eine entscheidende Rolle scheint das Endothelinsystem zu spielen, das eine renale Vasokonstriktion verursacht. Der häufig beobachtete oxidative Streß in der Niere könnte eine Folge desselben sein und es wird angenommen, daß die Nierenschädigung mit der Hypertonie kausal verbunden ist. Die Gabe von NO-Vorstufen (z.B. L-Arginin) oder Antioxidantien (z.B. Vitamin E) können dieser Art der Schädigung mit Erfolg entgegenwirken, jedoch ist der gesamte Pathomechanismus der Nierenschädigung zu komplex, so dass noch viele Schritte aufgeklärt werden müssen. Ein sehr guter Marker



für derartige hypoxische Zustände sind spezielle Prostaglandinmetaboliten, so z.B. das 8-Isoprostan (=8-epi-PGF<sub>2α</sub>) (Chehne, 2001; Helmersson, 1999; Helmersson, 2001; Fukunaga, 1993), welches auch in der vorliegenden Arbeit bestimmt wurde. Ein noch weitgehend unerforschter Ansatzpunkt sind möglicherweise toxische Wirkungen verschiedener CsA Metaboliten, die sich allerdings in der Mesangialzellkultur als weniger toxisch erwiesen als die Muttersubstanz (s. Kapitel 5).

## **Neurotoxizität**

Die Neurotoxizität des CsA tritt im Vergleich zu den bereits beschriebenen Nebenwirkungen klinisch nicht so häufig auf, doch werden immer wieder ernstzunehmende akute Komplikationen beobachtet. Chronische neurologische Störungen, wie Tremor, Schwindel und Parästhesien, sind eher als harmlos einzustufen und sind meist nach einer Dosisreduktion vollständig reversibel. Akute Zwischenfälle treten fast ausschließlich nach intravenöser Applikation, die oftmals bei Kindern aufgrund ihrer geringeren Resorptionsfähigkeit nötig ist, auf. Obwohl das CsA trotz seiner hohen Lipophilie nur schlecht die Blut-Hirn-Schranke überwindet (Molekulargewicht!), können bei intravenöser Anwendung durch kurzzeitig sehr hohe Blutspiegel auch toxische Konzentrationen im ZNS erreicht werden. Erleichtert wird die Penetration wahrscheinlich durch den Emulgator Chremophor EL, der CsA Formulierungen zur parenteralen Gabe enthalten ist. Die Folgen sind starke epileptiforme Anfälle und u.U. komatöse Zustände, die erst nach mehreren Stunden wieder abklingen. Es können aber Folgeschäden nicht ausgeschlossen werden, zumal CaN in der neuronalen Apoptose Kaskade eine wichtige Rolle einnimmt.

## **1.8 Calcineurin Phosphatase (PP-2B) : Struktur und Funktion**

### **Entdeckung**

Beinahe zeitgleich mit der Einführung des Sandimmun® vor 20 Jahren wurde auch die Ca<sup>2+</sup>- und Calmodulin- abhängige Serin/Threonin Proteinphosphatase *Calcineurin* (CaN) von Wang und Desai (1976) entdeckt. Sie trennten Zellextrakte aus Rinderhirn mittels Säulenchromatographie in Fraktionen auf und untersuchten diese auf ihre enzymatische Aktivität. Eine bestimmte Fraktion inhibierte die enzymatische Aktivität eines Gemisches aus Adenylatcyclase und verschiedenen Phosphodiesterasen vollständig. Sie konnten zeigen, dass kein freies Ca<sup>2+</sup> mehr im Versuchsansatz nachzuweisen war und schlossen daraus, dass in ihrer Fraktion ein Ca<sup>2+</sup> bindendes Enzym mit übergeordneten regulatorischen Eigenschaften enthalten sein muß. Das war richtig, und die Autoren nannten das Enzym, aufgrund seiner Lokalisation im Nervengewebe, Calcineurin. Parallel dazu untersuchte die Arbeitsgruppe um Cohen Zellextrakte auf ihre Fähigkeit das regulatorische Enzym Phosphorylase-Kinase zu dephosphorylieren. Eine Fraktion mit diesen Eigenschaften bezeichneten die Autoren als Phosphatase 2B (PP2B). Es stellte sich später heraus, dass CaN und PP2B identisch waren.

## Struktur

CaN ist ein Heterodimer aus einer katalytischen Untereinheit, CaN A, und einer regulatorischen, CaN B. Erstaunlich ist auch, dass dieses Enzym ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Cohen charakterisierte die Ser/Thr Protein Phosphatase Familie; neben PP2B existieren noch PP1, PP2A und PP2C, die alle essentielle regulatorische Funktionen in Signaltransduktionswegen in eukaryotischen Zellen besitzen. Die katalytische Untereinheit, CaN A, enthält eine Calmodulin (CaM) bindende und eine autoinhibitorische Domäne, die bei Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM das aktive Zentrum des Enzyms blockiert. Auch befindet sich in der katalytischen UE ein  $\text{Fe}^{3+}\text{Zn}^{2+}$ -Cluster um  $\text{PO}_4^{3-}$ -Gruppen hinreichend zu polarisieren und so zu übertragen (*Denesyuk, 1993, Etzkorn, 1994; Haddy, 1992*). Das für die Aktivierung notwendige  $\text{Ca}^{2+}$  wird mit hoher Affinität ( $K_d < 10^{-6}$  !) von der regulatorischen UE CaN B gebunden.

## Funktion

CaN ist in allen eukaryotischen Zellen vorhanden und übernimmt dort die Regulation über eine Unmenge von Signaltransduktionswegen, angefangen von Wachstumsregulationen bei Pilzen über Pheromonsignaltransduktionen bei Insekten bis hin zur Regulation der Neurotransmitterfreisetzung im Gehirn der Wirbeltiere.

In Säugetieren werden sogar die höchsten Gehalte im Gehirn gefunden (ca. 1% des Gesamtproteinanteils des Gehirns !), darüber hinaus in der Niere, im Fettgewebe, in der Leber und in T-Lymphozyten. Eine wichtige Rolle kommt ihm auch bei der cardialen Hypertrophie und neuronalen Apoptose über den Cytochrome C/Caspase- 3 Weg zu. In der Niere wird über CaN kontrollierte Signaltransduktionswege die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ATPase Aktivität in den Tubuli, die adrenerge, dopaminerge und angiotensinogene Rezeptorsignaltransduktion, sowie die Glucocorticoid- und die Mineralocorticoid-Signaltransduktion reguliert. Die Aktivität des CaN selbst wird primär über den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalt  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  gesteuert. Bei niedrigem intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  kann das Enzym kein CaM binden und ist damit inaktiv. Desweiteren kann eine Reihe endogener Substanzen, wie z.B. Protein Kinase A anchoring protein (AKAP79) oder cain/cabin 1 residue Phosphoprotein das Enzym nicht-kompetitiv hemmen. Es konnte auch gezeigt werden, daß die Casein Kinasen I und II die A Untereinheit am C-Terminus phosphorylieren können, jedoch wird die CaN Funktion dadurch nicht beeinflusst. Ob es sich hierbei um einen Regulationsmechanismus handelt ist noch ungeklärt.

Einer neueren Entdeckung zufolge enthält der Virus des afrikanischen Schweinefiebers ein Protein, A238L, das CaN blockiert und entgeht so der Immunabwehr des Wirtes. Auch die Idee, spezifische, synthetische Hemmstoffe des Enzyms als Antimykotika und Arzneistoffe gegen Parasiten (z.B. Malaria) (*Dobson, 1999*) einzusetzen, wird derzeit intensiv verfolgt.

---

## 2 Problemstellungen

### 2.1 Problematik der Generika des Sandimmun Neoral®

Cyclosporin A ist ein Pharmakon mit kritischer Dosierung ( “critical dose drug“ oder narrow therapeutic index drug : “NTI – drug“ ). Charakteristisch hierfür sind :

1. Eine steile Dosiswirkungskurve und eine geringe therapeutische Breite (  $LD_{25} / ED_{75}$  oder  $LD_{50} / ED_{50}$  )
2. Eine hohe inter- und intraindividuelle Variabilität der Bioverfügbarkeit
3. Starke Abhängigkeit der enteralen Resorption von der Arzneiform ( z.B. auf Basis einer „Mikroemulsion“ )
4. Eine engmaschige Kontrolle der Blutkonzentrationen (TDM: therapeutic drug monitoring) mit Bestimmung der AUC (area under the curve: Fläche unter der Kurve).
5. Keine einfache Dosierung nur nach Körpergewicht.
6. Lebensbedrohliche Konsequenzen bei geringfügigen Über- bzw. Unterdosierung bei transplantierten Patienten.

Beispiel: Eine erhöhte Abstoßungsrate manifestiert sich bei Nierentransplantierten bei einer  $AUC_{0-\infty} < 4400 \text{ ng} \cdot \text{h/ml}$  sowie eine verstärkte Nephrotoxizität bei  $AUC_{0-\infty} > 5500 \text{ ng} \cdot \text{h/ml}$  d.h. eine Differenz von nur **20-25%** sind von entscheidender Bedeutung für eine effektive immunsuppressive Therapie.

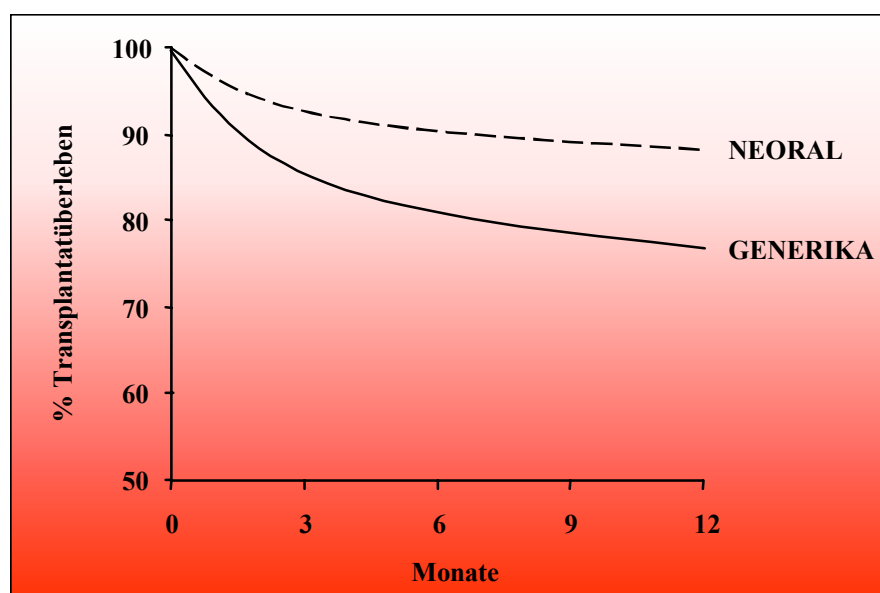
Berücksichtigt man weiter die falsch hohe Bestimmung der Blutkonzentrationen mittels eines hierfür häufig verwendeten Radioimmunoassays der Fa. Incstar, USA (**ca. 20%** höhere CsA Werte durch Mitbestimmung von Metaboliten) (*Jones, 1988; Khoss, 1988; Morris, 2000; Mraz, 1989*) so ergeben sich Differenzen zwischen Sandimmun Neoral® und z.B. dem neu auf den Markt gekommenen Cicloral®, die therapeutisch bei z.B. nierentransplantierten Patienten zu ernststen Konsequenzen im Hinblick auf eine erhöhte Abstoßungsrate führen können. Deshalb ist bei der Umstellung von Patienten von Sandimmun Neoral® auf eine Generikum aus pharmakologischer Sicht zu fordern: Für eine vergleichende Wirksamkeit derartiger Pharmaka müssen gleich hohe Wirkstoffspiegel im Blut erreicht werden, ggf. durch Anpassung der Dosis, sowohl in gesunden Probanden, als auch in OrganTX Patienten. Ergibt sich aus klinischen Studien, dass bei Gabe einer gleichen Dosis eine niedrigere Aufnahme des Wirkstoffes im Blut resultiert, muss die Dosis entsprechend erhöht werden, um gleiche Wirkstoffspiegel im Blut zu erhalten (*Kahan, 1999*). Der propagierte wirtschaftliche Vorteil der Generika wäre dann jedoch nicht mehr gegeben.

## 2.2 Untersuchungen zu Generika des Sandimmun Neoral®

Die Kostenexplosion in nahezu allen Gesundheitssystemen der Industriestaaten ruft Generikahersteller auf den Plan preislich günstigere Alternativen zu den Originalprodukten, wegen fehlender Investition in Innovationen, auf den Markt zu bringen. Es sind auf dem amerikanischen Arzneimittelmarkt 2 Präparate zugelassen worden und als bioäquivalent (AB-rated) zu Sandimmun®Neoral eingestuft worden:

1. Gengraf®, Abbott Laboratories, USA
2. Cyclosporin Capsules (USP modified), Eonlabs®, USA

Es ist jedoch pharmakologisch begründet darüber zu diskutieren, ob die gültigen Zulassungsverfahren für generische Arzneimittel geeignet sind für Arzneistoffe, die ein sehr enges therapeutisches Fenster besitzen. Denn die FDA, sowie auch das BfArM, verlangen für Generika nur eine Pharmakokinetikstudie an gesunden Probanden. Es ist bekannt, dass die Resorptionsverhältnisse bei transplantierten Patienten sich ändern können und auch Interaktionen mit einer Vielzahl von Arzneistoffen bedacht werden müssen. Es zeigt sich ein ungünstiger Trend nach Immunsuppression mit CsA-Generika (Abb.09, Opelz 2001).



**Abb. 09** Überlebensrate der Nierentransplantate (Leichenspende, 1.TX) von 1998-2000. (Opelz et al., 2001) Neoral n= 3654; Generika n=832

Um Klarheit über die Effektivität der oben beschriebenen Medikamente zu erhalten, sollte die Bioverfügbarkeit der 3 Präparate unter Transplanationsbedingungen an einem Rattenmodell überprüft werden und anhand pharmakokinetischer und klinischer Parameter verglichen werden.

### 2.3 Der Zusammenhang zwischen Nephrotoxizität, Transplantatabstoßung und dem Metabolismus des CsA

Über den funktionellen Zusammenhang zwischen Abstoßungsvorgängen und erhöhten Spiegeln an Metaboliten, sowie Nierenschädigungen des CsA gibt es bisher nur Vermutungen. Man stellt lediglich bei einer Vielzahl von Patienten mit Abstoßungsepisoden erhöhte Metabolitenkonzentrationen fest (v.a. AM4N und AM9, vgl. Kap. 4). Ob die Metaboliten zur Immunsuppression beitragen oder das nephrotoxische Agens sind wird diskutiert, (Fahr et al., 1990, sie könnten auch nur ein Epiphänomen einer verzögerten intestinalen Resorption sein (Lindbergh-Freijis et al., 1994). Es ist unmöglich diese beinahe ausschließlich aus Zellkulturversuchen erhobenen Daten mit organtransplantierten Patienten zu vergleichen, da zum einen das Auftreten von Metaboliten Zeit- und Gewebe-abhängig ist, zum anderen eventuelle additive oder synergistische Effekte mitbedacht werden müssen (Koehler et al., 2002). Unklar ist weiterhin, ob bestimmte Metaboliten als klinische Kennzeichen für Abstoßungsreaktionen geeignet sind und welche Metaboliten möglicherweise bedeutsam zur Charakterisierung einer verzögerten Resorption sind.

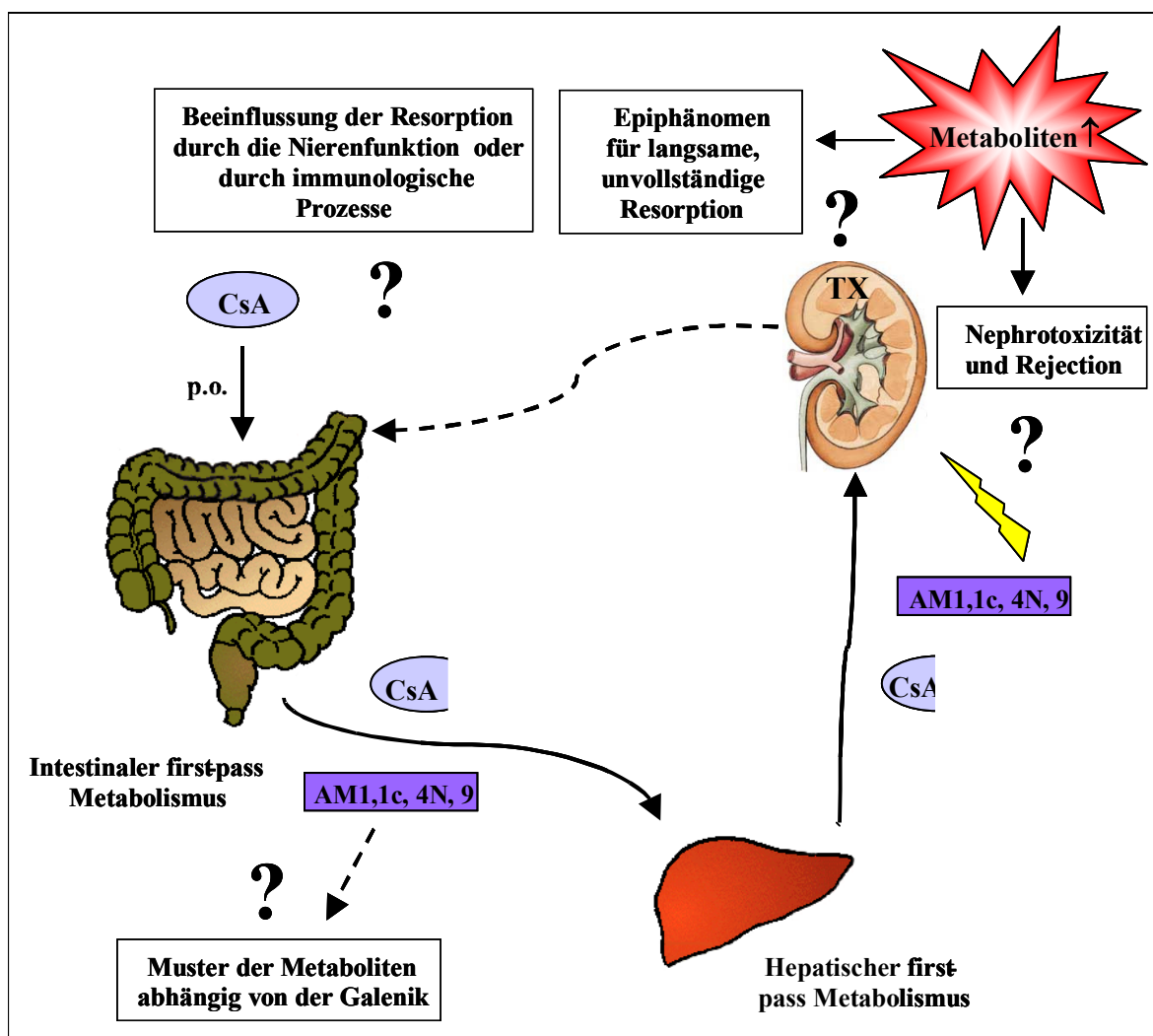


Abb. 10 Hypothetischer Circulus vitiosus zwischen Nephrotoxizität, Organabstoßung und Metabolismus des Cyclosporin A

Betrachtet man diese einzelnen Probleme von einer höheren Warte aus, so könnte man an einen *circulus vitiosus* der Transplantatdysfunktion der Niere denken (Abb.10).

Es gibt mehrer Ansatzpunkte, die größeren Schwankungen der Bioverfügbarkeit des CsA nach Organtransplantationen zu erklären. Zum einem wird eine schlechtere Nierefunktion als bei gesunden Probanden dafür verantwortlich gemacht, wofür es bisher nur Ergebnisse von Versuchen mit Ratten unter akutem Nierenversagen gibt (*Shibata et al., 1998*). Die Ratten zeigen unter akutem Nierenversagen signifikant niedrigere CsA Talspiegel als gesunde Ratten. Zum anderen könnten entzündliche Erkrankungen des Intestinums für eine schlechtere Resorption des CsA verantwortlich sein. Gastrointestinale Komplikationen (Acidose) treten nach Organtransplantationen häufig auf und können durch Blutungen zu letalen Zwischenfällen führen (*Skala et al., 1997, Benoit et al., 1993*). Die Rolle von Cytokinen in diesem Zusammenhang ist unbekannt.

Unklar ist auch ob und in wie weit der Metabolismus des CsA nach einer Organtransplantation verändert ist und wenn ja, welche Konsequenzen sich daraus für das Transplantat bzw. den Patienten ergeben.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, Hinweise für die oben angeführten vermuteten Zusammenhänge experimentell an Ratten nach Nierentransplantation zu erhalten.

---

## 3 Materialien

### 3.1 Versuchstiere

Für die experimentellen Tierversuche wurden ausschließlich normotensiv männliche Wistar-Kyoto Ratten (WKY) verwendet (Fa. Charles River, Sulzfeld). Das Alter der Tiere betrug ca. 8 Wochen. Als Nierenspender für die Transplantationen dienten Brown Norway Ratten.

#### Wistar-Kyoto-Ratte (Albino Ratte, WKY)

Nach Selektionierung des Wistar-Stammes zu Beginn des letzten Jahrhunderts im Wistar-Institut in den USA wurden diese Tiere als Inzuchtstamm im Glaxo-Laboratorium weitergeführt. Nach Hysterektomie 1974 in den Charles River Laboratories in den USA gelangten diese Tiere 1986 zur Charles River GmbH in Sulzfeld. Dieser Rattenstamm wird als hämodynamisch physiologisches Versuchstier verwendet. Wegen des gemeinsamen Ursprungs ist die WKY der geeignete Kontrollstamm zu der spontan hypertensiven Ratte (SHR).

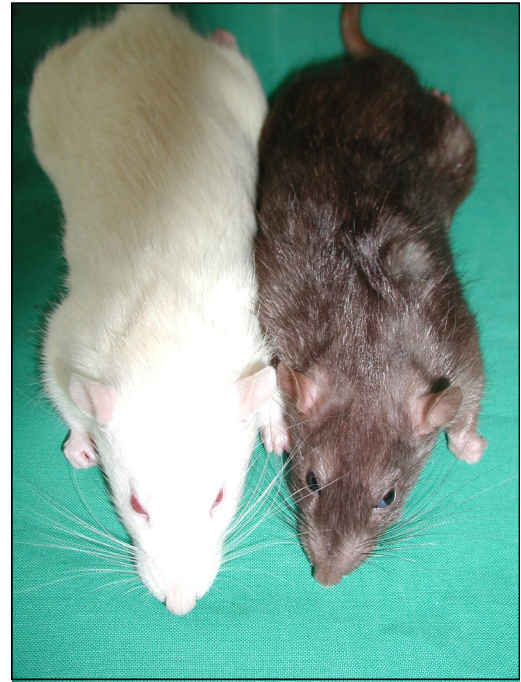


Abb. 11 WKY (links) und BN (rechts) Ratten

#### Brown Norway Ratte (BN; braune Ratte)

Nachdem histokompatible Individuen aus einer Mutantenkolonie von Silvers und Billingham 1958 selektioniert worden waren, wurde dieser Stamm von King und Aptekman am NIH (Bethesda, USA) weitergeführt. Kommerziell genutzt wurden die Tiere erstmals von der Firma Microbiological Associates, Inc., Walkersville (Maryland, USA). Seit 1988 ist die BN Ratte weltweit als Versuchstier verfügbar.

### 3.2 Chemikalien und Pharmaka

#### 3.2.1 Chemikalien

1,1,1 Trichloressigsäure  
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (=Tris)  
2-Mercaptoethanol  
3,4-Dihydroxy-benzylaminhydrobromid (DBA)  
Acetonitril zur Chromatographie  
Acrylamid

Fa. Rotiphorese  
Boehringer, Mannheim  
E. Merck, Darmstadt  
Fa. Sigma, Deisenhofen  
J.T. Baker B.V., Deventer, Holland  
Fa. Sigma Deisenhofen

aktiviertes Aluminiumoxid	Woelm Pharma GmbH, Eschwege
Amoniumperoxiddisulfat (APS)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Biurett Reagenz	Fa. Sigma, Deisenhofen
Butyl-hydroxy-toluol (BHT) (=2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol)	E. Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat	E. Merck, Darmstadt
Chloroform p.a.	E. Merck, Darmstadt
CsA Metaboliten (AM1, AM1c, AM4N, AM9)	Fa. Novartis, Nürnberg
Cyclosporin D	Recipe, München
Propylenglykolum	BUFA, Niederlande
D-(+)-Glucose-Monohydrat	E. Merck, Darmstadt
ECL RPN 2106	Fa. Sigma Deisenhofen
Ethanol 99.8 % (Rotipuran)	Carl Roth GmbH & Co. Karlsruhe
Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (=EDTA=Titriplex II)	E. Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-Bisaminoethylether Tetraessigsäure (=EGTA)	E. Merck, Darmstadt
Glücksklee Magermilchpulver	Fa. Sigma, Deisenhofen
Glycin	Fa. Amersham
Heptan p.a.	Recipe, München
Hyperfilm ECL	Fa. Fluka
Interleukin-2 (rekomb.,rat) in PBS	R&D Systems, Wiesbaden
Isopropanol	E. Merck, Darmstadt
Isotonische Kochsalzlösung	B. Braun, Melsungen
Kaliumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck, Darmstadt
L(+)-Ascorbinsäure	E. Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat Heptahydrat	E. Merck, Darmstadt
Methanol zur Chromatographie	J.T. Baker B.V., Deventer, Holland
Methylcellulose	Caesar & Lorenz, Hilden
Natriumacetat	E. Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	E. Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat	E. Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	E. Merck, Darmstadt
Natriumoctansulfonat	E. Merck, Darmstadt
Phenol p.a.	E. Merck, Darmstadt
Phosphorsäure p.a.	E. Merck, Darmstadt
Phthaldialdehyd	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Polysorbat 80/20 (Tween 80; Tween 20)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ponceau rot /Methylenblau	Fa. Amersham
Reinstwasser f. d. Chromatographie	Recipe, München
Sarcosyl (Natrium-N-Lauroylsarcosin)	Fa. Rotiphorese
Sequenzgel Puffer Konzentrat Rotiphorese®	Fa. Merck
Sequenziertgel Rotiphorese®	Fa. Amersham
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fa. Sigma
TEMED	Fa. Sigma
Zinksulfat (10%) in Methanol /Acetonitril	Recipe, München
<u>Alma Versuchstierfutter</u> :	Alma Botzenhard, Kempten

Zusammensetzung : Getreide; Erzeugnisse und Nebenerzeugnisse aus der Verarbeitung von Ölsaaten; Fischerzeugnissen; Erzeugnisse und Nebenerzeugnisse der Zuckergewinnung; Öle und Fette; Milcherzeugnisse; Bierhefe; Zusatzstoffe-Vormischung.

Gehalt an Inhaltsstoffen: 24% Rohproteine; 1,5% Lysin; 0,5% Methionin; 4,0% Rohfett; 5,0% Rohfaser; 7,0% Rohasche; 1,0% Calcium; 0,8% Phosphor; 0,5% Natrium; 0,25% Magnesium;

Zusatzstoffe pro kg Mischfutter: 25 000 I.E. Vitamin A; 1000 I.E. Vitamin D; 250 mg Vitamin E (Alpha Tocopherolacetat); 100 mg Vitamin C.



### 3.2.2 Pharmaka

Sandimmun® Optoral (=Neoral) 100mg N3 Kapseln	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
Ch.Bez. : F33	
Gengraf® 100mg Capsules 2x50	Abbott Laboratories, USA
LOT : 59479AF22	
Cyclosporin Capsules (USP-modified) 100mg 2x50	EonLabs,USA
LOT : B000399	
Tramal® (Tramadol) Amp 50 mg N2	Fa. Grünenthal, Aachen
Sevorane® (Sevofluran) Liq. 250ml	Fa. Abbott, Wiesbaden
(Fluoromethyl-2,2,2-trifluoro-1-(trifluoro)-ethyl ether)	(Inhalationsnarkotikum)
Betaisodona® Lösung 100ml	Fa. Mundipharma, Limburg
Liquemin® (Heparin) 10.000 Amp N2	Fa. Roche,
Gentamicin Substanz	Caelo
Elektrolyt-Infusion E153 500ml	Serumwerk Bernburg AG
Sauerstoff für medizinische Zwecke	Klinikum der Universität Regensburg
Isotone NaCl Lösung 0,9% 100ml	Fa. Braun, Melsungen

### 3.3 Geräte und Instrumente

Absaugtopf		Machery-Nagel, Düren
Analysenwaagen	Typ H 51-handy	Sartorius, Göttingen
	Typ 1202 MP	
Autoklav	KSG 112	
Gamma-Counter	Compugamma CS 1282	LKB, Freiburg
Gel-Elektrophorese:	Model S2 Sequencing Gel	Fa. Gibco BRL Life Technologies
Gel-Trockner:	Model 583 Gel Dryer	Fa. Bio Rad
Heißluftschüttler	Innova 4000	New Brunswick Scientific
Heizblock	Thermomix 5436	Fa. Eppendorf
Homogenisatoren	Ultra Turax, Typ 18-10	Janke und Kunkel, Breisgau
	Branson Sonifer B15	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
	Disruptor	
Imager	Instant Imager	Packard
Kältetruhen	Revco Ultima 1090-5VUB	W. Pabisch, München
	Privileg 031.352 8	Quelle, Fürth
Kältetruhen	Revco Ultima 1090-5VUB	W. Pabisch, München
Kühlschrank	Privileg 031.352 8	Quelle, Fürth
Kühlschrank	FKS 3600	Fa. Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank	FKS 3600	Fa. Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph
Ölpumpe	Typ B5/2208	Edwards
pH-Meter	Digital pH-Meter	Knick
Photometer	Novaspec 4049	Shimadzu, Düsseldorf
Power Supply:	EPS 3500	Fa. Pharmacia
Reflotron Diagnostic		Fa. Boehringer, Mannheim
Schlundsonde	Animal Feeding Needle,	TSE, Kronberg/Ts.
	75 x 1.5 mm	
Schüttelwasserbad	Typ CS 20	MGW Lauda
Szintillationszähler	Tri Carb 1500	Packard
Vakuumzentrifuge	Univapo 150 H	Uniequix
Vortexgeräte	Model G540 E	Fa. Bender & Hobein Genie 2
Wasseraufbereitung	Milli-Q Water Purification	Waters, Eschborn
	System	
Wasserbad	Modell W13	Hanke
Zentrifuge	Minifuge II Typ 4123	Heraeus Christ, Osterode
Zentrifuge	Centrifuge 5403	Fa.Eppendorf

Zentrifuge	Biofuge B	Heraeus Christ, Osterode
<b>Einmalartikel</b>	Kanülen Sterican (versch. Gr.) Monovetten 10 ml Perfusor-Spritze Pipettenspitzen PPN-Röhrchen 4,5,14 ml Spritzen 2,5,10 ml Heidelberger Verbindung Connecta Plus3	Braun, Melsungen Sarstedt, Nümbrecht B. Braun, Melsungen Abimed, Düsseldorf Greiner, Nürtingen Braun, Melsungen Braun, Melsungen B&D, Hamburg
Chir. Nahtmaterial	Sharpoint 10-0, 8-0 (Polyamid) Terylene 2-0	Fumedica, Hamburg Serag-Wiessner, Naila
Hautklammergerät	Appose ULC 35W	Davis & Geck, USA
<b>HPLC-Geräte</b>		
Autosampler	SIL10A	Schimadzu, Duisburg
Dämpfer	Bourdonrohr 80 cm	Schimadzu, Duisburg
Detektor	SPD-10AV	Schimadzu, Duisburg
Drucker	NEC Pinwriter P6 plus	NEC Deutschland GmbH, München
Integrator	Gynkosoftware Chromatography Data System, Version 3.12	Gynkotek, Germering
Pumpe	LC-10AT	Schimadzu, Duisburg
Säule	Phenomenex Synergi Phenomenex Phenylhexyl	Phenomenex, USA
Säulenofen	ERC 125 HPL	Fa. Schreiber, Reinbach
Operationsbesteck	Pinzetten, Scheren, Skalpelle	Martin Medizin-Technik, Tuttlingen
Operationsmikroskop	OPMI pico	Fa. Zeiss, Jena
<b>Mikro-Operationsinstrumente</b>		
Mikropinzetten n. Müller		Fa. Aesculap AG, Tuttlingen
Mikroscheren n. Müller		Fa. Aesculap AG, Tuttlingen
Mikronadelhalter n. Müller		Fa. Aesculap AG, Tuttlingen
Nachstarschere n. Vanna		Fa. Aesculap AG, Tuttlingen
Approximatoren n. Biemer		Fa. Aesculap AG, Tuttlingen
Gefäßclips n. Biemer		Fa. Aesculap AG, Tuttlingen
Mikrokauter		Albrecht, Nümbrecht
Bauchdeckenhalter n. Müller		Fa. Aesculap AG, Tuttlingen

### 3.4 Verwendete konventionelle analytische Methoden (Assays)

#### Rat IL-2 ELISA

Der IL-2 Gehalt im Plasma und im Nierengewebe wurden nach erfolgter Transplantation mittels eines Test Kits der Firma R&D Systems, Minneapolis (USA) bestimmt. Das Blutplasma wurde direkt zur Bestimmung eingesetzt. Zur Analyse der Organproben wurden jeweils 50mg Gewebe mit 1 ml TRIS Puffer versetzt und im Ultra-Turrax homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 10.000 rpm wurden 10 µl des Überstandes für die Analyse verwendet.

#### 8-Isoprostan EIA

Die 8-Isoprostan (=8-epi-PGF<sub>2α</sub>) Konzentration im Urin der Versuchstiere wurde mit einem Test Kit der Firma Cayman Chemical Company, Michigan (USA) bestimmt. Zur Gewinnung der Proben wurde den Auffanggefäßen der Stoffwechselkäfige 100µl einer 1%-igen (m/v) Lösung von BHT in Ethanol als Antioxidans zugesetzt. Der Urin wurde direkt für die Bestimmung verwendet.

#### Plasma-Renin-Aktivität (PRA) (RIA)

Die PRA wurde mit einem Radioimmunoassay (RIA) der Firma DiaSorin, Düsseldorf gemäß der Anleitung durchgeführt. Eingesetzt wurden je 500 µl Plasma (EDTA) und die Differenz zwischen der ANG-I Bildung bei 37°C und 4°C gebildet.

### 3.5 Statistik

Alle Messdaten sind als arithmetische Mittelwerte ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ; Standardfehler des Mittelwertes) ausgedrückt.

Alle Daten wurden mittels ANOVA (einfaktorielle Varianzanalyse) für die interindividuellen Vergleiche und für die intraindividuellen Vergleiche anhand des zweiseitigen Student's t-Test verglichen.

Dabei wurde folgende Irrtumswahrscheinlichkeit als statistisch signifikant angesehen:

$p < 0,05$  : ★ bzw. **a, b, c** usw.

Die Anzahl der Versuchstiere ist mit „n“ bezeichnet

Die pharmakokinetischen Parameter  $T_{\max}$  und  $C_{\max}$  wurden direkt ermittelt, die AUCs 0 bis  $T_{\text{last}}$  wurden mit der Trapezmethode berechnet.

### 3.6 Abkürzungsverzeichnis

% (m/v)	Gehaltsangabe des DAB: Massenprozent pro Volumen (100ml) (Konventionsmethode)
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> Konzentration
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm (10 <sup>-6</sup> g)
µl	Mikroliter
8-IP	8-Isoprostan (=8-epiPGF <sub>2α</sub> )
A.	Arterie
AA	Amino acid
Abb.	Abbildung
ANG-I	Angiotensin I
AS	Aminosäuren
AT-1	Angiotensin -1 Rezeptor
AT-2	Angiotensin -2 Rezeptor
AT-R	Angiotensin Rezeptor
AUC	Area under the (concentration-time) curve
BN	Brown Norway Ratte
bp	Basenpaare
BP	Blutdruck (blood pressure)
C <sub>1</sub> usw.	Plasmakonzentration 1h usw. nach Applikation
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaN	Calcineurin
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
c-fos	Transkriptionsfaktor, der im Zellkern lokalisiert ist (Phospho-Protein, "immediate early Gen")
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
c-jun	Transkriptionsfaktor, der im Zellkern lokalisiert ist (Phospho-Protein, "immediate early Gen")
C max	maximale Plasmakonzentration
c-myc	Transkriptionsfaktor
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
cpm	counts per minute
cRNA	copy-Ribonukleinsäure
CsA	Cyclosporin A
CsD	Cyclosporin G
Cyp	Cyclophilin
CYP3A4	Cytochrom-P 450 3A4
CYT-P450	Cytochrom-P 450
d	Tag
DAB	Deutsches Arzneibuch
DBA	3,4-Dihydroxybenzylamin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desonucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
e-NOS	endotheliale Nitric Oxide Synthase
EPO	Erythropoetin
ET-1, -2, -3	Endotheline 1, 2 und 3
ET <sub>A, B</sub>	Endothelin Rezeptoren A und B
EtOH	Ethanol
ETS	Endothelin System
Fa.	Firma
FDA	Food and Drug Administration, U S A
FK 506	Tacrolimus
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GC	Guanylatcyclase
G <sub>i</sub>	inhibitorischer G-Protein gekoppelter Rezeptor
GIT	Verdauungstrakt
GM-CSF	Granulocyten-/Makrophagen- Colony Stimulating Factor
GSH	Glutathion
h	Stunde
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HP	Hybridisationspuffer
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
i.a	Intraarteriell
I.E.	Internationale Einheit (z.B. bei Heparin)

IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-2	Interleukin 2
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
JNK	c-Jun Amino-terminale Kinase
K <sub>d</sub>	Diffusionskonstante
kDA	Kilodalton
KG	Körpergewicht
L-Arg	L-Arginin
mg	Milligramm ( $10^{-3}$ g)
MHC	Major Histocompatibility Complex
min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MM	Missmatch
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n.d.	nicht detektierbar
NF-ATc/n	Transkriptionsfaktor; cytosolische und nukleäre Komponente
n.s.	nicht signifikant
ng	Nanogramm ( $10^{-9}$ g)
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid, Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthetase
NSAID	Nicht-steroidale antiinflammatorische Arzneistoffe
NTX	Nierentransplantation
OD	optische Dichte
OP	Operation
OW	Öl in Wasser (Emulsion)
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAC	Plasma-Aldosteron Konzentration
p.o.	peroral
pg	Pikogramm ( $10^{-12}$ g)
PG	Prostaglandin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGF <sub>2</sub>	Prostaglandin F <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
PP-2B	Phosphatase 2B (=Calcineurin)
PRA	Plasmareninaktivität
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
r	Korrelationskoeffizient
RAAS	Renin Angiotensin Aldosteron System
RAS	Renin Angiotensin System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s(ys)BP	systolischer Blutdruck
S.E.M.	Standardabweichung des Mittelwerts
s.o.	siehe oben
SAS	sympatho-adrenales System
SD	Sprague-Dawley Ratte
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SEDDS	Self emulsifying drug delivery system
Sek.	Sekunde
sHLA	soluble human leukocyte antigen
SMEDDS	Self microemulsifying drug delivery system
SNS	sympatho neuronales System
SR	Referenzstandard (HPLC)
SS	steady state
Stabw (SD)	Standardabweichung (Standard Deviation)
T max	Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration C <sub>max</sub>
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TBE	Tris-Borat-EDTA
TDM	Therapeutic drug monitoring
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
TGF	Transforming growth factor
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
tRNA	transfer Ribonucleinsäure
TX	Transplantation, Transplantat
u	Unit
UE	Untereinheit

ÜN	über Nacht
UNOS	United Network for Organ Sharing
UV	Ultraviolett
V.	Vene
Vol	Volumen
VSM	vascular smooth muscle
WKY	Wistar-Kyoto Ratte
WO	Wasser in Öl (emulsion)
ZNS	zentrales Nervensystem

---

## 4 Methoden

### 4.1 Tierhaltung

Für die Tierversuche wurden männliche, 8 Wochen alte Wistar Kyoto Ratten benutzt und paarweise in Käfigen (42 x 26 x 18 cm) gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Als Standardfutter wurde Altromin® Pellet-Diät für Ratten und Mäuse gegeben. Das Streumaterial (Altromin® Tiereinstreu Fasern) wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Es wurde auf folgende, für Nager optimale Haltungsparemeter geachtet:

- Temperatur:  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- relative Luftfeuchtigkeit:  $55\% \pm 5\%$
- Hell - Dunkel Intervall: 12h

Vor Beginn der Versuche wurden die Tiere über einen Zeitraum von 5 Tagen an die Bedingungen adaptiert. Die Tötung der Ratten erfolgte durch Dekapitation nach vorangegangener Inhalationsnarkose mit Sevofluran.

Die orale Applikation der Cyclosporindispersion (ca. 1ml) erfolgte mittels einer Schlundsonde am Vormittag (gegen 9.00 Uhr) eines jeden Versuchstages. Zuvor wurden täglich das Körpergewicht bzw. der Futter- und Wasserverbrauch ermittelt.

Nach der Transplantation wurden die Ratten in Einzelkäfigen bei adäquater Analgesie und täglicher Desinfektion des Käfiges unter aseptischen Bedingungen gehalten, wobei auch die Operationswunde untersucht und ggf. gesäubert und desinfiziert wurde. Bei den geringsten Anzeichen von unzumutbaren Schmerzen trotz analgetischer Medikation wurde bei dem entsprechenden Tier der Versuch unverzüglich abgebrochen.

### 4.2 Planung der Tierversuche

Bei allen Tierversuchsreihen wurde zusätzlich ein unbehandeltes Kontrollkollektiv von 6 WKY Ratten mitgeführt. Bei der Planung der Tierversuche wurde großer Wert darauf gelegt die Versuchsreihen so effektiv zu gestalten, um die Anzahl der Versuchstiere so niedrig wie möglich zu halten.

#### 4.2.1 Dosisfindung und Überprüfung der Dosislinearität anhand der trough Spiegel des CsA und dessen Metaboliten

Zur Ermittlung der Talspiegel im Plasma sowie in den Organen bei unterschiedlichen Dosierungen der drei CsA Medikamente wurden die Versuchstiere (WKY) wie folgt in Gruppen eingeteilt:

Dosierung [mg/kg*d]	Medikament	n
1	Neoral, Gengraf, Eonlabs	3 x 6
3	Neoral, Gengraf, Eonlabs	3 x 6
10	Neoral, Gengraf, Eonlabs	3 x 6
30	Neoral, Gengraf, Eonlabs	3 x 10

Der auftretenden Mortalität bei einer Dosierung von [30 mg/kg\*d] von etwa 30% wurde in der Anzahl der Versuchstiere in dieser Gruppe Rechnung getragen. Des Weiteren konnten in dieser Versuchsreihe dosisabhängige Metabolisierungsvorgänge, sowie die Effektivität der CsA Organspiegel auf die Hemmung der Calcineurinaktivität untersucht werden. Außerdem konnten die dosisabhängigen Auswirkungen auf die mRNA Genexpression des Renins, der Cyclooxygenasen-1 und -2, der Endotheline-1 und -3, der Endothelin Rezeptoren, sowie der Kollagene-1 und -3 und des Fibrinogens untersucht werden.

#### 4.2.2 Vergleich der drei CsA-Pharmaka an nierentransplantierten Ratten

Die Pharmaka wurden an nierentransplantierten und zugleich nephrektomierten Ratten hinsichtlich der unten genannten Parameter untereinander, sowie mit verschiedenen Kontrollgruppen verglichen. Da es sich bei Wistar-Kyoto Ratten um einen Inzucht-Rattenstamm (inbred) handelt, sind sie als Spender und gleichzeitig als Empfänger für Transplantationsversuche zur Testung immunsuppressiver Therapien ungeeignet, da das Transplantat nicht abgestoßen wird. Es wurde daher auf ein Modell nach *Miller et al., 1962* und *Shehader et al., 1970* zurückgegriffen und Brown-Norway Ratten als Spender-, sowie Wistar-Kyoto-Ratten als Empfängertiere verwendet. Um statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten war eine komplizierte Gruppeneinteilung nötig. Zur Bestimmung des Serum Creatinins wurde den Tieren nach 1, 3 Wochen je 0,5 ml Blut aus der Schwanzarterie entnommen. Des Weiteren wurden die Tiere nach 1, 3 und 6 Wochen für 24h in Stoffwechselkäfigen gehalten, sowie einer Blutdruckmessung unterzogen. Nach 6 Wochen endete die Versuchsreihe und die Tiere wurden nach folgenden Gesichtspunkten hin untersucht:

##### a) Hinsichtlich der Medikation:

- CsA Bioverfügbarkeit und Organkonzentrationen
- Blut- und Organspiegel der Metaboliten AM1, AM1c, AM4N, AM9
- CsA- und Metaboliten- Exkretion in den Urin
- IL-2 Gehalt im Plasma und Nierengewebe

##### b) Hinsichtlich der Nierenfunktion bzw. -schädigung:

- Histologie der Niere, sowie Immunohistochemie auf Renin und COX-2
- Bestimmung der 8-Isoprostan ( 8-iso-PGF<sub>2α</sub>) Ausscheidung in den Urin (24h Sammelurin), sowie der Serum Creatinin Konzentration (SCrea)
- Genexpression (mRNA) des Renins, der Cyclooxygenasen -2, -1 (COX-2, -1), der Endotheline -1 und -3 (ET-1, ET-3), der ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub> Rezeptoren, sowie der Kollagene -1, -3 und des Fibrinogens in den Nierenzonen (Cortex, OM, IM)
- Systolischer Blutdruck (sysBP)
- Plasmareninaktivität (PRA)



## Gruppeneinteilung:

Gruppe	Beschreibung	Zweck	Bezeichnung
1. Kontrolle 1	WKY unbehandelt	Normalkollektiv	K
2. Kontrolle 2A	WKY, Neoral 10 [mg/kg*d]	Bestimmung des Einflusses des Medikaments (MK)	NEO
3. Kontrolle 2B	WKY, Gengraf 10 [mg/kg*d]	“	GEN
4. Kontrolle 2C	WKY, Eonlabs 10 [mg/kg*d]	“	NEO
5. Kontrolle 3A	WKY, rechts nephrektomiert, links retransplantiert	Bestimmung des Einflusses der Operation und Nephrektomie (Anastomose, Hypoxie etc.) (OPK)	ITX („Isograft“)
6. Kontrolle 3B	wie 3A , zusätzlich Neoral 10 [mg/kg*d]	Bestimmung des Einflusses der OP, Nephrektomie und Medikation (OPK)	ITX+
7. Kontrolle 4A	WKY, rechts nephrektomiert, links allotransplantiert, Neoral 1 [mg/kg*d]	Unterdosierte Kontrollgruppe zur Erzielung einer manifesten Abstoßung	TXL („low-dose“)
8. Kontrolle 4B	WKY, Neoral 1 [mg/kg*d]	Medikationskontrolle (MK) zu 4A	NEOL („low-dose“)
9. Kontrolle 5A	WKY, rechts nephrektomiert	Bestimmung des Einflusses der Nephrektomie (OPK)	UNX
10. Kontrolle 5B	Wie 5A, zusätzlich Neoral 10 [mg/kg*d]	Bestimmung des Einflusses der Nephrektomie und Medikation (OPK)	UNX+
11. Transplant Neoral	WKY, rechts nephrektomiert, links allotransplantiert, Neoral 10 [mg/kg*d]	Vergleichende Untersuchung der Transplantatfunktion, - abstoßung etc. (TX)	TXNEO
12. Transplant Gengraf	Wie 11., anstatt Neoral hier Gengraf 10 [mg/kg*d]	“	TXGEN
13. Transplant Eonlabs	Wie 11., anstatt Neoral hier Eonlabs 10 [mg/kg*d]	“	TXEON

## Abkürzungen:

MK	Medikationskontrolltiere; nur Medikation über 6 Wochen
OPK	Operationskontrolltiere : ITX, ITX+, UNX, UNX+
ITX(+)	Isotransplantierte und nephrektomierte Tiere; + = mit Medikation (nur Neoral)
UNX (+)	Unilateral nephrektomierte Tiere; + = mit Medikation (nur Neoral)
TX	Allotransplantation

#### 4.2.3 Bestimmung der Pharmakokinetik (Blut- und Organkinetik) des CsA

Grund für die Bestimmung der Pharmakokinetik des CsA bei den 3 Pharmaka im Vollblut sowohl in den Organen, sowie der Kinetik der Metaboliten, war die Diskrepanz zwischen den Tal- Spiegeln des CsA im Plasma und im Gewebe aus Versuch 4.2.1 (s. 6.1.1).

Gruppeneinteilung:

Dosis [mg/kg*d]	Zeitpunkt [h]	Pharmaka	n
10	2	Neoral, Gengraf, Eonlabs	3 x 6
10	4	Neoral, Gengraf, Eonlabs	3 x 6
10	8	Neoral, Gengraf, Eonlabs	3 x 6
10	12	Neoral, Gengraf, Eonlabs	3 x 6
10	24	Neoral, Gengraf, Eonlabs	3 x 6

Zum Zeitpunkt  $t=0$  wurde je ein Versuchstier aus jeder der 5 Gruppen getötet um so den Talspiegel zu bestimmen ( $C_0$ -Wert, trough-Spiegel). Die restlichen Versuchstiere wurden jeweils zu den angegebenen Zeitpunkten dekapitiert.

#### 4.2.4 Untersuchungen zur Pharmakokinetik des CsA nach Nierentransplantation

Es ist bekannt und von klinischem Interesse, dass die Bioverfügbarkeit des CsA nach einer Organtransplantation viel stärker schwankt als bei gesunden Probanden. Insbesondere bei NierenTX, LeberTX und PankreasTX finden sich oft häufig nicht erklärbare subtherapeutische Wirkstoffspiegel.

Hierzu wurden folgende pharmakokinetische Tierversuche im steady-state des CsA durchgeführt.

Gruppeneinteilung:

Gruppe	Beschreibung	Zweck	Bezeichnung
1. Transplant Neoral	WKY, rechts nephrektomiert, links allotransplantiert, Neoral 10 [mg/kg*d]	Pharmakokinetik nach TX	TXNEO
2. Kontrolle 1A	Niereninsuffiziente Versuchstiere, Gentamicin i.p. Neoral 10 [mg/kg*d]	Bestimmung des Einflusses der Nierenfunktion auf die Pharmakokinetik	NI
3. Kontrolle 1B	NaCl 0,9% i.p. Neoral 10 [mg/kg*d]	Kontrolle zu 1A	KNI
4. Kontrolle 2A	mit IL-2 vorbehandelte Versuchstiere; Neoral 10 [mg/kg*d]	Bestimmung des Einflusses des IL-2 auf die Pharmakokinetik	IL
5. Kontrolle 2B	Mit Carrier von 2A vorbehandelte Gruppe	Kontrolle zu 2A	KIL

Es wird häufig postuliert, die schlechtere Nierenfunktion nach NierenTX im Vergleich zu gesunden Probanden sei der Grund für die reduzierte Bioverfügbarkeit des CsA (s. 2.3). Dieser Hypothese wurde mit einem niereninsuffizienten Versuchstierkollektiv Rechnung getragen. Die Tiere wurden 8 Tage hintereinander mit 100 mg/kg\*d Gentamicin (50 mg/ml in isotoner Kochsalzlösung) (Erdem *et al.* 2000) und gleichzeitig mit 10 mg/kg\*d Neoral p.o. vorbehandelt. Einer Kontrollgruppe wurde anstelle des Gentamicins nur isotone NaCl Lösung i.p. injiziert. Des Weiteren wurde der Annahme (s. 2.3) nachgegangen, die Reduzierung der Bioverfügbarkeit könne die Folge eines immunologischen Prozesses sein, denn obwohl das CsA die IL-2 Produktion hemmt, findet man nach TX doch erhöhte IL-2 Spiegel, welche im Normalkollektiv nicht nachweisbar sind. Weiterhin gibt es mehrere Anhaltspunkte von Cytokin-vermittelten Entzündungsprozessen, die die Bioverfügbarkeit des CsA reduzieren. Den Versuchstieren wurde rekombinantes Ratten IL-2 (1µg/µl in 0,01M PBS pH 7,4) in einer osmotischen Pumpe (Koide *et al.*, 1995) parallel zur CsA Medikation p.o. über 8 Tage kontinuierlich appliziert. Einer Kontrollgruppe wurde eine Pumpe nur mit PBS implantiert. Kurz vor der Implantation wurden die osmotischen Pumpen (Alzet mini osmotic pump Modell 2002; Flussrate 0,5µl/h; Füllvolumen 227± 9 µl) befüllt und in isotoner Kochsalzlösung aufbewahrt. Die Versuchstiere wurden unter Sevoflurannarkose und Beatmung auf dem Bauch gelagert und die Pumpe durch einen ca. 1,5 cm langen Schnitt in der Nackenhaut subkutan platziert. Die Wunde wurde im Anschluss an die OP mit Hautklammern und Sprühpflaster verschlossen.

#### 4.2.5 Applikation und Dosierung der CsA Kapseln

Aus den Kapseln wurden zur oralen Applikation täglich frische wässrige Dispersionen in definierten Verdünnungsstufen hergestellt. 1 Kapsel (100mg) wurde in 16 ml Wasser aufgelöst. Da der Kapselinhalt ein Mikroemulsionspräkonzentrat darstellt bildet sich nach Auflösen der Gelatine kapsel in Wasser eine milchige Dispersion. Die auf diesem Wege hergestellte Stammlösung hat eine Konzentration von 6,25 mg Cyclosporin A pro Milliliter, die im Anschluss weiterverdünnt wurde:

Verdünnungsstufe der Stammlösung	CsA Konzentration [mg/ml]	Dosis [mg/kg*d]
-	6,25	30
1:3	2,1	10
1:10	0,63	3
1:30	0,21	1

Die Dosierung des Arzneistoffs erfolgte über das Volumen der peroral applizierten Dispersion. So bekam z.B. eine 200 g schwere Ratte bei einer Dosierung von 1 mg pro kg Körpergewicht und Tag einen Milliliter der 1:30 Verdünnung, entsprechend 0,2 mg.

#### 4.2.6 Plethysmographische Blutdruckmessung

Anhand der indirekten plethysmographischen Blutdruckmessung wurde der Verlauf des systolischen Blutdrucks (sysBP) während der 6-wöchigen Behandlungszeit beobachtet. Die Messung erfolgte mit einem BP-Recorder 8005 der Firma W+W Electronics, Basel (CH). Nach Immobilisierung der Tiere erfolgte die Messung des Blutdruckes und der Herzfrequenz nach ca. 15 min an dem aufgewärmten Rattenschwanz (Vasodilatation) in einer durch Umluft auf 36°C temperierten Plastikbox. 2 Wochen vor Versuchsbeginn wurden die Tiere regelmäßig dafür trainiert. Nach dem Anlegen der Druckmanschette und des Druckaufnehmers (Piezokristallring) wurden die arteriellen Schwankungen auf einen Thermoschreiber übertragen und aufgezeichnet (*Ikeda et al., 1988*). Sind die Schwanzarterien vollständig abgedrückt, werden keine Schwankungen mehr registriert.

#### 4.2.7 Vorbereitung der Tiere auf die Operation

Am Vorabend der TX wurde den Tieren das Futter entzogen, um das Darmvolumen bei der OP möglichst klein zu halten. Die Ratten wurden durch Inhalationsnarkose mit Sevofluran (4 Vol% + 96% = 0,3 l/min O<sub>2</sub> Gerät: Trajan 808 (Firma Dräger)) und durch einen venösen Zugang an der Pfote (G26 Verweilkanüle) auf die OP vorbereitet. Über diesen Zugang erhielten die Ratten während der OP eine kontinuierliche Elektrolytinfusion (E153, Serumwerk Bernburg) mittels eines Perfusors zur Volumensubstitution und Kreislaufstabilisierung.

Wie bereits unter 4.2.2 erwähnt, wurden als Spendertiere BN- und als Empfängertiere WKY-Ratten verwendet. Empfänger und Spender wurden gleichzeitig narkotisiert und auf speziell angefertigten OP-Tischen liegend beatmet.

Als erstes wurde das **Spendertier** auf die TX vorbereitet, indem durch Eröffnung des Peritoneums der Verdauungstrakt freigelegt wurde. Das Intestinum wurde vorsichtig in sterile, feuchte Gaze gepackt und extrakorporal positioniert.

Der Retroperitonealraum war nach vorsichtiger, stumpfer Präparation (z.B. Wattestäbchen) zugänglich. Im Anschluß kann das **Empfängertier** auf die gleiche Art und Weise vorbereitet und in der Folge bei beiden Tieren die entsprechende Blutgefäße freipräpariert werden. Zunächst müssen die IVC, die Aorta, die A. renalis und V. renalis der linken Niere vorsichtig freigelegt werden, etwaige Verzweigungen der Nierengefäße werden ligiert. Die Vorbereitungen der Organentnahme werden durch Auslösen der Spenderniere aus ihrer bindegewebigen Verankerung beendet.

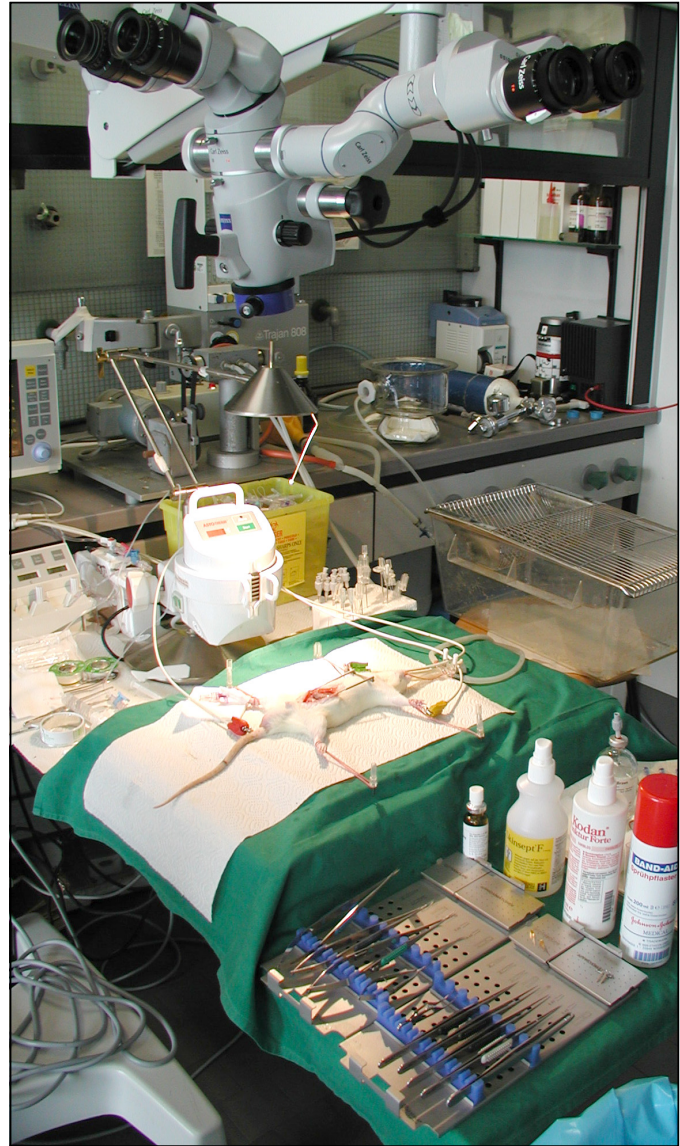


Abb. 12 Ratten OP mit einem laparotomierten Versuchstier

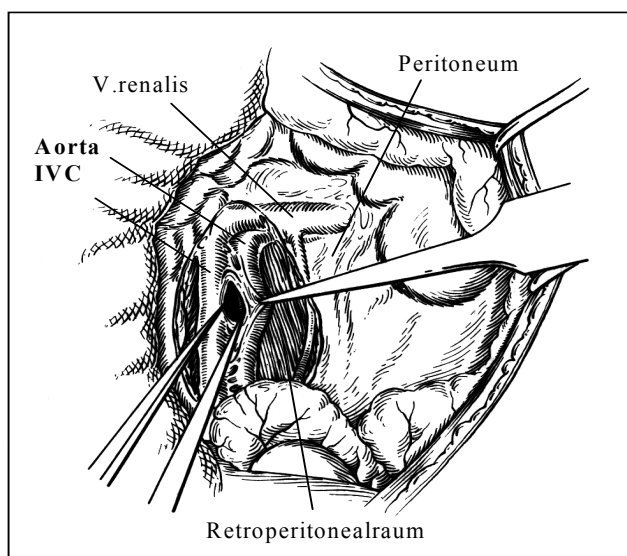
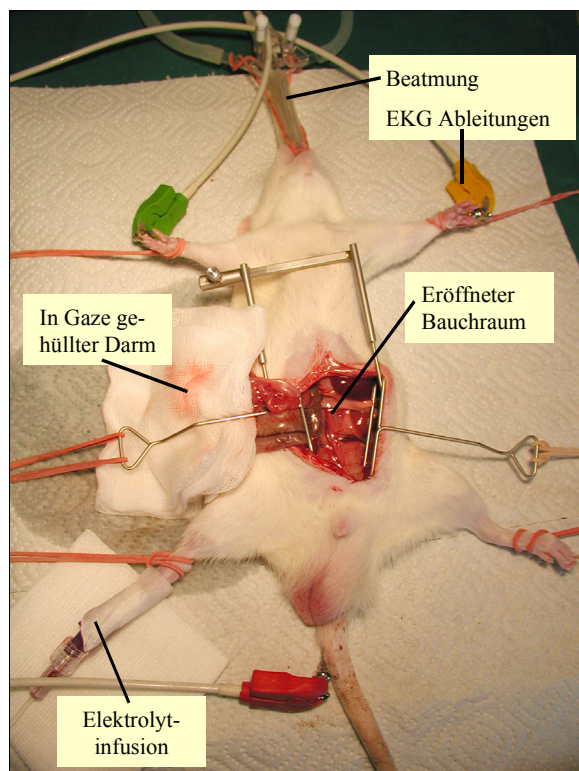
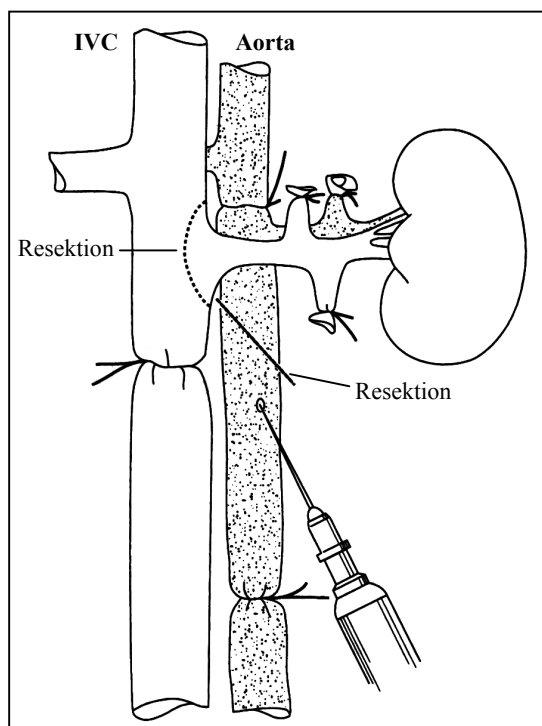


Abb. 13 Präparation der Peritonealgefäße



**Abb. 14** Vollständig auf TX vorbereitete Ratte

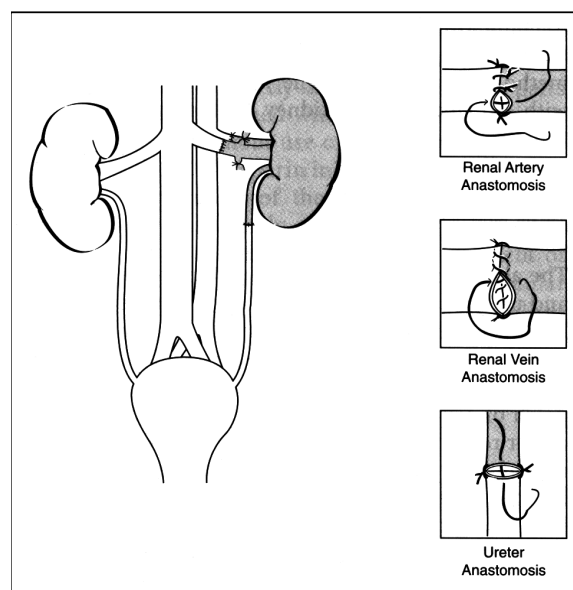


**Abb. 15** Spülen der Niere vor der Entnahme

#### 4.2.8 Nierentransplantation und Mikrochirurgie

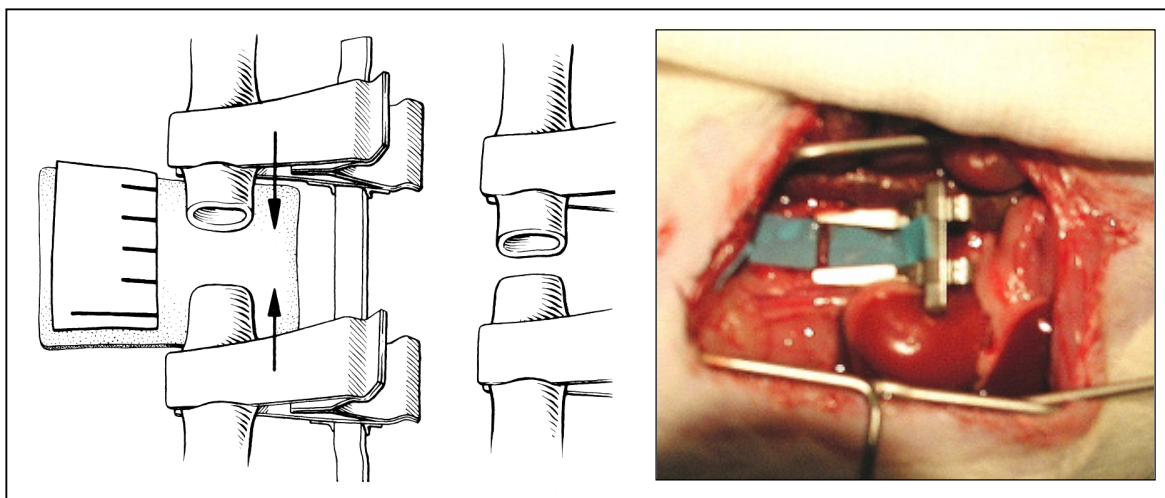
Nach intensiven theoretischen und praktischen Anleitungen durch einen Mikrochirurgen (OA Dr. med. T. Kühnel; HNO Klinik der Universität Regensburg) und viel Übung war es möglich die Transplantationen eigenständig durchzuführen. Die Transplantation der Nieren erfolgte orthotop mittels end-to-end Anastomosen der A.renalis, der V.renalis und des Ureters (*Miller, 1962*). Vor der Ektomie des Spenderorgans muss dieses durch Spülen mit heparinisierte Ringerlactat-Lösung (50 IE/ml, 4°C) gereinigt werden. Hierzu werden die Aorta und die IVC im Bereich (ca. 3 cm) des Zu- bzw. Abgangs der Nierengefäße ligiert. Durch Injektion von etwa 3 ml Lösung (s.o.) in das abgebundene Segment der Aorta kann die Niere blutfrei gespült (s.Abb.-14). Nach erfolgter Spülung werden die Nierengefäße mit einem

**Abb. 16** Darstellung der orthotopen NierenTX mit end-to-end Anastomosen (*Timmermann, 1988*)





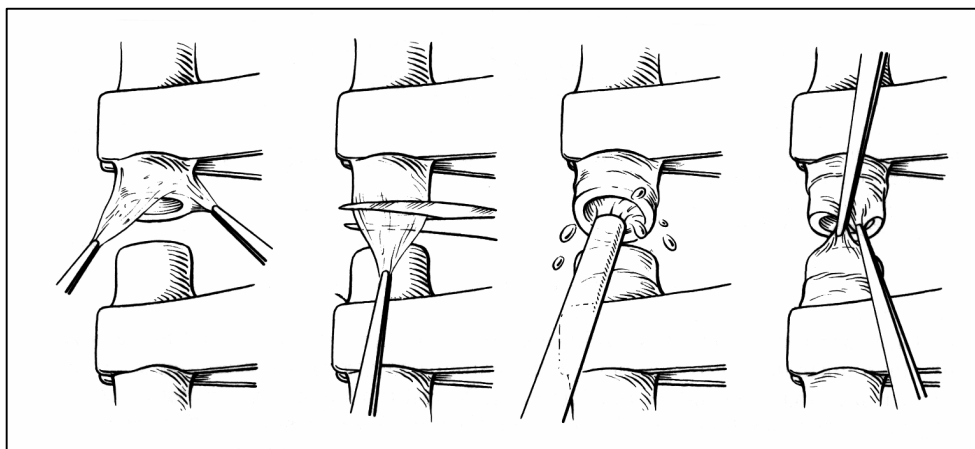
Approximator an den Verzweigungsstellen zur IVC und Aorta abgeklemmt und durchtrennt. Das Organ wird nach abschneiden des Ureters im oberen Drittel entnommen, wobei an der A. renalis ein Aortenpatch verbleibt. Das Organ wird sofort in kalter Ringerlactatlösung auf 4°C abgekühlt. In vitro kann dann die A. renalis sauber durch Entfernen des Aortenpatches präpariert werden. Zur Implantation muss die Niere ständig durch feuchtes Gaze und Eis auf 4°C gekühlt werden. Nachdem die Nierengefäße des Empfängers in den zweiten Clip des Approximators, der mit dem Transplantat verbunden ist, eingeklemmt wurden (Abb.17), werden die Gefäßstümpfe nach Irrigation mit isotonischer Kochsalzlösung zunächst noch von der Adventitia (nur Arterien) befreit, da diese eine starke thrombogene Wirkung besitzt (Abb.18).



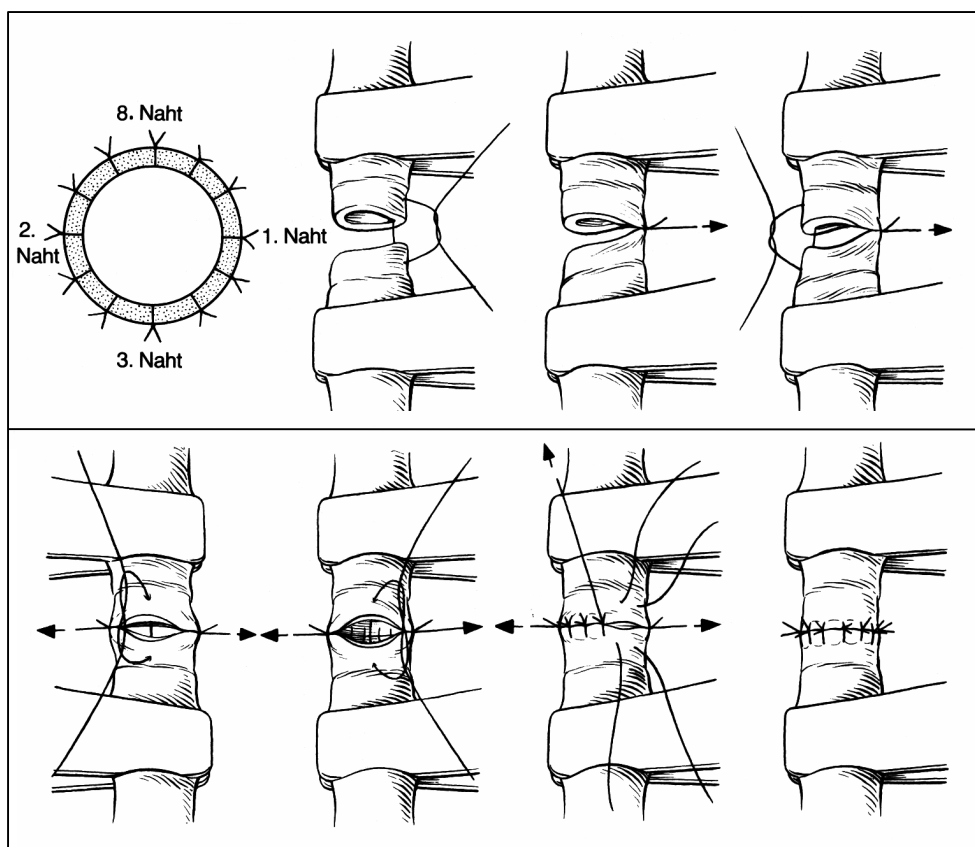
**Abb. 17** Anlegen des Approximators und Unterlage einer Plastikfolie zur Verbesserung der Sicht. (Mehdorn, 1987; eigenes Foto)

Nun kann die Anastomose der A. renalis mit zwei Fixierknoten im Winkel von ca. 140 Grad beginnen (Abb.19). Die arterielle Anastomose wird mit 6 Einzelknoten und einem 10-0 Nahtmaterial (Polyamid) vollzogen, wobei die Unterlage einer gefärbten Plastikfolie die Sicht erleichtert. Im Anschluss daran kann die venöse Anastomose erfolgen, die sich etwas schwieriger gestaltet, da das Gefäß keine Muscularis wie die Arterie besitzt und es somit im kollabierten Zustand vorliegt. Durch mehrmaliges Spülen mit isotonischer Kochsalzlösung kann das Lumen wieder erweitert werden, das vorübergehende Einführen eines kleinen Silikonschlauches erleichtert die ersten Fixierstiche. Man muss bei den sehr dünnen Gefäßwänden der Venen sehr genau darauf achten nicht die Vorder – und Rückwand miteinander zu vernähen. Die Anastomose erfolgt auch hierbei mit 2 Fixierknoten aber dann mit einer kontinuierlichen Naht. Ist alles geglückt, können die Anastomosen auf ihre Dichtigkeit hin überprüft werden, indem man zuerst den venösen Clip des Approximators vorsichtig öffnet und etwas Blut rückströmen lässt, danach öffnet man den arteriellen Clip und stillt die auftretende Blutung durch andrücken von Wattestäbchen bis das austretende Blut die Nahtlöcher durch Koagulation verschlossen hat. Es ist äußerst wichtig, dass das Empfängertier bis zu diesem Zeitpunkt kein Heparin bekommen hat, da sonst die hier erwünschte Koagulation zum Verschluss der Nahtlöcher

ausbleibt oder sich verzögert. Wenn die Anastomose dicht ist werden dem Tier ca. 50 IE Heparin über den venösen Zugang verabreicht.



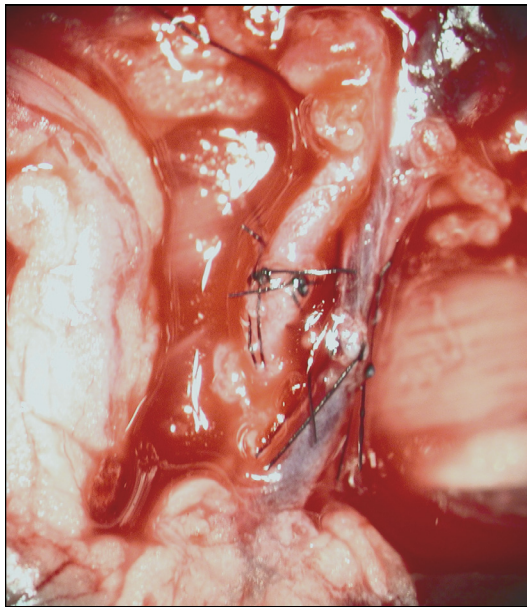
**Abb. 18** Entfernen der Adventitia und Irrigation der Gefäßstümpfe.  
(Mehdorn, 1987)



**Abb. 19** Beginn der arteriellen Anastomose mit 2 Fixierknoten. Die komplette Anastomose ist hier mit 8 Knoten dargestellt (Mehdorn, 1987).



An diesem Punkt entscheidet sich über Erfolg oder Misserfolg der TX, denn verfärbt sich das Organ nun nicht binnen ca. 5- 10 min wieder gleichmäßig dunkelbraun, so ist die OP missglückt. Vasospasmen können die Perfusion anfangs etwas verzögern, jedoch sollte die Niere in dem o.g. Zeitintervall „anspringen“. Ein weiteres großes Problem ist die Thrombenbildung in den Nierengefäßen und im Transplantat, deswegen sollte frühzeitig wie oben erklärt Heparin gegeben werden. Der Zeitpunkt der Heparinabgabe ist eine Gradwanderung und entscheidet oft über den Erfolg der TX. Hilfreich ist es auch, vor der Implantation mit einer Insulinnadel 1 oder 2 kleine Löcher in das Organ zu stechen, aus denen nach erfolgtem Gefäßanschluss etwas Kapillarblut austreten kann und somit eine gute Perfusion indiziert. Abschließend muss noch der Ureter angeschlossen werden. Dies geschieht im oberen Drittel des Ureters, da er hier das größte Kaliber besitzt. In der Regel sind 4 Einzelknoten ausreichend. Die Niere sollte jetzt noch mit 4-5 Knoten mit dem sie umgebenden Fett- und Bindegewebe verbunden werden (8-0 Nahtmaterial). Zuletzt wird



**Abb. 20** Erfolgreiche Anastomosierungen der A. und V. renales (*Eigenes Foto*)

erkannt werden (ITX+). Um den Effekten der Nephrektomie Rechnung zu tragen wurden noch 2 unilateral nephrektomierte Kollektive mit (UNX+) und ohne (UNX) CsA untersucht.

die native rechte Niere noch entfernt. Hierfür werden die Nierengefäße und der Ureter je einzeln ligiert (8-0 Nahtmaterial) und durchtrennt. Nach Relokation des Intestinums wird die Bauchdecke mit einem 3-0 Nahtmaterial in einer kontinuierlichen Naht verschlossen und die Bauchhaut geklammert. Als abschließende Medikation bekommt die Ratte weitere 50 IE Heparin und 25 [mg/kg] Tramadol über den venösen Zugang injiziert, danach wird die Narkose beendet. Um einer postoperativen Hypothermie vorzubeugen werden die Ratten für ca. 30 min unter eine Rotlichtlampe gelegt. Das Protokoll der Kontrollgruppen (ITX und ITX+), die unilateral nephrektomiert, sowie retransplantiert (Isograft) werden ist identisch. Hierbei sollen die operationsbedingten Organschäden erfasst werden (ITX) und mögliche synergistische Effekte der CsA Toxizität und der OP Schäden

#### 4.2.9 Dekapitation und Organentnahme

Am Ende der Versuchsdauer wurden die Ratten mit Sevofluran narkotisiert und anschließender dekapitiert. Nach Entnahme der Organe wurden diese sorgfältig gesäubert, mit isotoner Kochsalzlösung gespült um sie von Blut zu reinigen und sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren (snap frozen). Bis zu weiteren Untersuchungen wurde das biologische Material bei -70°C gelagert. Die Nieren wurden vor dem

Einfrieren mit einem Skalpell makroskopisch in die Zonen Cortex, äußere Medulla (OM) und innere Medulla (mit Papille) (IM) unterteilt.

### 4.3 Isolierung der RNA

#### 4.3.1 Gewinnung der gesamten RNA

Die Gesamt- RNA der Nierenzonen wurde nach einer modifizierten Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) isoliert. Bei sämtlichen Arbeitsvorgängen wurde zur Vermeidung von Kontamination mit RNasen Latexhandschuhe getragen und RNase freie Einmalartikel und Geräte benützt. Ferner wurden alle Arbeiten auf Eis ausgeführt. Alle Lösungen wurden mit 0.1%-igem Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wasser angesetzt. Das Gewebe wurde in einem Ultra Turrax Mixer mit 10 ml Lösung D sofort vollständig homogenisiert. Zu dem Homogenat wurden nacheinander 1 ml 2 mM Natriumacetat (pH 4), 10 ml wassergesättigtes Phenol und 2 ml Chloroform zugesetzt. Dabei wurde nach jeder Zugabe gevortext. Nach einer 20-minütigen Kühlung auf Eis und folgender Zentrifugation (4°C, 10000 g, 30 min) wurde aus dem Überstand mit gleichem Volumen Isopropanol die RNA ausgefällt und pelletiert (4°C, 10000 g, 30 min). Für die folgende Reinigung wurde das Pellet in 500 µl Lösung D resuspendiert und mit dem doppelten Volumen Ethanol (absolut) ausgefällt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Pellets mit Ethanol (70%) gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und schließlich in DEPC-Wasser resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

Lösung D:	4 M Guanidin Thiocyanat 25 mM Na-Citrat; pH 7.0 0.5% Sarcosyl 100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 10 mM EDTA 1/10 vol Natriumacetat 2 M (pH 4.0) (vortexen)
Phenol, wassergesättigt:	geschmolzenes Phenol (Merck) + 1 vol Wasser + 0,1% Hydroxychinolin (Merck)
2 M Natriumacetat pH4:	2 M Natriumacetat (Merck) pH 4 in H <sub>2</sub> O / DEPC

Die isolierte RNA wurde bei 260 nm und 280 nm photometrisch vermessen und so die Konzentration bestimmt. Aus dem Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm wurde die Qualität der isolierten RNA bestimmt. Für die Versuche wurde nur RNA mit einem Quotienten zwischen 1,5 und 2,0 verwendet.

## 4.4 Quantifizierung der mRNA mit dem RNase Protection Assay

### Grundlagen

Bei dem RNase Protection Assay wird eine, zur mRNA des entsprechenden Genes komplementäre, radioaktiv markierte RNA (cRNA-Sonde) benutzt, welche mit hoher Spezifität mit der jeweiligen mRNA hybridisiert wird. Die erhaltenen stabilen Hybride sind vor RNase-Abbau geschützt und werden mittels Gelchromatographie aufgetrennt. Über die enthaltene Radioaktivität werden diese dann quantifiziert.

#### 4.4.1 Herstellen einer radioaktiven cRNA Sonde

Mittels eines käuflichen Plasmid-Kit von Quiagen® konnte für den Protection Assay Plasmid DNA in hoher Reinheit und in größerer Menge isoliert und gereinigt werden. Zunächst wurde am Vorabend eine 200 ml ÜN Kultur (LB-Medium: 1% Bactotrypton, 0,5% Bactoyeast, 1% NaCl in Wasser, autoklavieren) mit einem Teil der Glycerinkultur (diese wurden freundlicherweise vom Lehrstuhl für Physiologie I, Prof. Dr. Kurtz zur Verfügung gestellt) angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien bei 4000 rpm 15 min pelletiert und mit den Pufferlösungen nach Herstellerprotokoll weiterbehandelt. Nach der Lysierung der Zellen folgt eine Reinigung der DNA über eine Säule. Nach anschließender Fällung mit Isopropanol und Zentrifugation (4°C, 15000 g, 30 min) wurde der Isopropanol abgesaugt, die Pellets getrocknet und in 200 µl Wasser<sub>bidest</sub> gelöst. Anhand einer photometrischen Bestimmung bei 260 nm wurde die Ausbeute an DNA ermittelt.

### Kontrollverdau der Plasmide

Die isolierten Plasmide wurden mit dem jeweiligen Restriktionsenzym linearisiert. Die Auftrennung erfolgte, nach einer Phenol / Chloroform Extraktion, auf einem 1%igem Agarosegel in 1x TBE-Puffer; nachdem 2µl Ladepuffer zu den Proben hinzugefügt wurden. Neben dem vollständig linearisierten Plasmid (200 ng) wurden daneben 200 ng vom zirkulären Vektor aufgetragen, um die Linearisierung zu überprüfen. Als komplett linearisiert galt der Vektor wenn sich nur eine Bande zeigte und wenn der geschnittene Vektor deutlich langsamer lief als das zirkuläre Plasmid.

#### *Ansatz für die Plasmidlinearisierung:*

Ansatz:	Plasmid	20 µg
	Restriktionsenzym	100 units ( <i>Hind</i> III: 100 units))
	1x Ofa-Puffer	10 µl (Mengen vom Enzym abhängig)
	Aqua bidest	ad 100 µl
	2 h / 37°C	nach 1 h 1 µl Enzym zupipettieren

*Plasmide:*

cDNA	linearisiert mit	geschütztes Fragment (bp)
COX-2	HINDIII	356
β-Aktin	HINDIII	306
Renin	HINDIII	296
ET-1	Bgl-I	154
ET-3	BamH	140
ET <sub>A</sub>	ECOR V	290
ET <sub>B</sub>	ECOR V	330

**„In vitro Transkription“**

Mittels einer in vitro Transkription mit der SP6 Polymerase wurde unter Einbau von [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] GTP eine radioaktiv markierte cRNA Sonde hergestellt. Der Reaktionsansatz pro Sonde erfolgte nach der Anweisung von „Amersham Riboprobe System<sup>®</sup>“:

0.9 µl	dNTP-Mix (UTP, CTP, ATP, je 6,66 mM)
1,2 µl	5x Transkriptionspuffer
0.6 µl	DDT (200 mM, RNase-Inhibitor)
vortexen, zentrifugieren	
3.25 µl	Mix aus oben
5.0 µl	$\alpha$ -32P-GTP (= 50µCi)
1.0 µl	Template (linearisiertes Plasmid, 1 µg / 1µl)
1.0 µl	SP6-RNA-Polymerase (= 80 units)
0.8 µl	RNasin (Promega, 20 units / µl)

Diese Mischung wurde 90 min bei 40°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte der Abbau der überschüssigen Plasmid DNA durch DNase 1 (7.5 U/µl) bei 40°C für 20 min. Die Abtrennung von nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden erfolgte über Sephadex G50 Säulen, die zuvor mit TE-Puffer (TE+0,1% SDS) bei 1000 rpm für 3 min equilibriert wurden. Der Ansatz wurde auf die Säule gegeben, zentrifugiert und bei -20°C in 220 µl Ethanol mit 2 µl tRNA (in DEPC-Wasser) und 10 µl Natriumacetat (3 M, pH 4,8) für 1 Stunde gefällt. Die Sonde wurde dann abzentrifugiert (20 min, 15000 rpm, 4°C) und in 100 µl Hybridisationspuffer gelöst. Nach einer Denaturierung bei 95°C für 15 min wurden 2 µl der cRNA Sonde in ein Szintillationsglas mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben (Rotiszint<sup>®</sup> 22) und in einem β-Counter (1500 CarbTM, Packard Inst. Company Downer Grove II.) gezählt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

*Lösungen zur Sondenmarkierung:*

Sephadex G50:	2 g Sephadex® G-50 (Pharmacia Biotech) 50 ml Tris/EDTA- Puffer 0.1 % SDS
Tris/EDTA (TE)-Puffer:	2 M Tris-HCL (pH 7,5) 0.5 M EDTA (pH 8)
TE Puffer / 0,1% SDS (TES)	TE-Puffer 0.1 % SDS (20 %); in DEPC
Hybridisierungspuffer:	40 mM PIEPES (pH 6.4) 400 mM NaCl 80 % Formamid (Endkonzentration)

**4.4.2 Hybridisierung der RNA Proben**

Die RNA Proben wurden aufgetaut und die entsprechende Menge (1-100 µg) in Eppendorf Cups pipettiert. Das Wasser wurde in der Vakuumzentrifuge abgezogen und das RNA Pellet in 50 µl Hybridisierungspuffer (HP) aufgenommen. Gleichzeitig wurden 2 µl tRNA (10 µg/µl) ebenso in 50 µl HP gelöst. Zu allen Proben und zur t-RNA wurde dann 500.000 cpm radioaktiv markierte cRNA Sonde hinzupipetiert und bei 95°C für 15 min erhitzt. Es folgte eine Hybridisierung ÜN (mind. 6 bis max. 18 h) im Wasserbad bei 60°C. Durch Zugabe von RNase A und T1 (RNase Verdau) wurden die nicht geschützten RNA Moleküle abgebaut. Der Abbau der einzelsträngigen RNA erfolgte bei RT für 30 min. Danach wurden die Proteine mittels Proteinase K (37°C, 30 min) abgebaut und der komplette Ansatz mittels einer Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt. Aus dem wässrigen Überstand wurde die hybridisierte RNA mit Ethanol und tRNA für 1 h bei -20°C ausgefällt (430 µl Überstand + 900 µl EtOH + 2 µl tRNA). Die Proben wurden dann abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach Zugabe von 5 µl Ladepuffer und anschließendem denaturieren (95°C, 15 min) wurden die Proben auf ein 8% Acrylamidgel mit 1x TBE als Ladepuffer vertikal aufgetrennt.

**4.4.3 Gelelektrophorese und Signalauswertung der Röntgenfilme**

Das denaturierende Acrylamidgel wurde bereits am Vortag hergestellt unter Verwendung eines Acrylamid Gelmixes (Rotiphorese® DNA Sequenziersystem). Die Polymerisation des Acrylamidgels erfolgte mit 8% Ammoniumpersulfat (in Wasser) und Temed (Sigma). Dann wurde das Gel gegossen (Geldicke 0,5 mm). Vor dem Auftragen der Proben lief das Gel bei 80 Watt 30 min mit 1x TBE Puffer, wobei die Geltaschen sorgfältig gespült wurden. Die Auftrennung erfolgte für ca. 120 min bei 80 Watt. Danach wurde das Gel abgenommen, eine Glasplatte entfernt und das Gel in einem Gemisch aus 10 Teilen Essigsäure, 10 Teilen Methanol und 80 Teilen Wasser fixiert. Nach Überführung des Gels auf Whatman-Papier wurde es im Vakuum für 1 bis 2 h getrocknet.

## Signalauswertung und Entwicklung der Röntgenfilme

Der Film wurde 1-3 Tage bei  $-70^{\circ}\text{C}$  exponiert. Nach dem Entwickeln (Entwickler-, Unterbrecher- und Fixierlösung von Agfa wurden nach Vorschrift hergestellt) wurden die Hybridisierungssignale sichtbar. Die Signale wurden dann eindeutig den jeweiligen Proben zugeordnet. Die Messung der Radioaktivität der einzelnen Gele erfolgte in einem Instant Imager (Instant Imager 2024, Hewlett Packard, Electronic Autoradiographie) mit der dazugehörigen Spezialsoftware. Für die Auswertung der Signale wurden die Counts per minute (cpm), korrigiert um die zum Referenzdatum angegebene Aktivität und um den Wert für die tRNA.

### Lösungen für RNase Protection Assay:

RNase-Puffer:	10 mM Tris/HCL pH 7.5 (Endkonzentration) 5 mM EDTA pH 8.0 300 mM NaCl
Proteinase K-Lösung:	1 mg/ml Proteinkinase K in RNase-Puffer + 200 $\mu\text{l}$ SDS(20 %) / ml
RNase Stammlösung:	4 mg / ml RNase A (Boehringer) 200 $\mu\text{g}$ / ml RNase T1 (Boehringer) in RNase Puffer
Polyacrylamid (8%):	Rotiphorese® Kit der Fa. Roth, Karlsruhe 320 ml Konzentrat 480 ml Verdünner 100 ml Puffer
Polyacrylamidgel:	45 ml Polyacrylamid (8%) 45 $\mu\text{l}$ TEMED / 280 $\mu\text{l}$ APS (8%)
Ladepuffer:	0.1 % Bromphenolblau 0.1 % Xylencyanol 80 % Formamid in 1x TBE
DEPC-H <sub>2</sub> O:	1 / 1000 Vol Diethylpyrocarbonat in H <sub>2</sub> O ÜN geöffnet unter Abzug, dann autoklavieren
Phenol / Chloroform:	AquaPhenol (Appligene) mit 1M Tris/HCl (pH 8) + 100 % Chloroform + 0,1 % Hydroxichinolin

## 4.6 Quantitative Analyse des Cyclosporins und dessen Metaboliten in verschiedenen organischen Matrices

Mit Hilfe der HPLC wurden die Cyclosporinspiegel und die Konzentrationen der CsA Metaboliten im Blut und in den Organen Niere, Leber, Thymus und Milz sowie im Urin bestimmt. Ein hierfür verfügbarer Kit der Fa. Recipe, München, für die CsA Bestimmung im Vollblut mittels HPLC, der in zwei Probeläufen verwendet wurde, stellte sich jedoch

als unzureichend heraus, bei einem ungünstigen Kosten Nutzen Verhältnis. Die Fa. Recipe benutzt ein binäres Gradientensystem (Acetonitril und Methanol/Wasser) zur Elution von CsA und dessen Metaboliten an einer C-18 Säule. Bestrebt die Trennung des CsA und dessen Metaboliten zu verbessern und zugleich die Kosten niedrig zu halten wurden andere Wege beschritten. Die entwickelte Methode stützt sich auf einem isokratisches Elutionssystem mit dem internen Standard Cyclosporin D (*Brozmanova et al., 2001*), lediglich für die Probenvorbereitung wurde auf Teile des Kits zurückgegriffen. Zudem wurde auch ein binäres Stufengradientensystem etabliert.

#### 4.6.1 Probenvorbereitung

Zur Aufbereitung der Organproben wurden 50-100 mg Gewebe in einem 4,5 ml PPN Röhrchen mit 1ml isotonischer Kochsalzlösung und 100 µl interner Standardlösung (500 ng CsD) versetzt und im Ultraturrax 2-3 Sekunden lang homogenisiert. Das so erhaltene Zellysatz wurde mit 2 ml Präzipitationslösung (10%-ige Zinksulfatlösung mit Acetonitril und Methanol) zur Proteinausfällung versetzt und 2 min bei 4000 rpm in einer Megafuge zentrifugiert. Für die Blutproben entfällt der Homogenisationsschritt, d.h. ihnen werden nach Zusatz des internen Standards direkt die Präzipitationslösung zugesetzt. Der Überstand wurde auf ein mit Methanol und Reinstwasser (pH3) konditioniertes Extraktionssäulchen (C8-Material) überführt und mit einer Vakuumbox langsam durch die Packung der Säule gesogen, wobei das CsA, das CsD und die Metaboliten adsorbiert werden. Nun schlossen sich 2 Waschvorgänge an, sowohl mit 3 ml Acetonitril/ Wasser Lösung, um polare Verunreinigungen zu entfernen, als auch mit 500 µl Heptan für lipophile Stoffe.

Danach konnten die zu analysierenden Stoffe mit einer Ethanol-Ethylacetat Lösung (Recipe, München) desorbiert werden. Zur Sicherheit wurde das Eluat nochmals zur Entfernung lipophiler Begleitstoffe mit 1ml Heptan versetzt und ausgeschüttelt. Die untere Ethanolphase wurde, nach Verdünnung mit 100 µl Reinstwasser für die HPLC Analytik verwendet. Die Vorbereitung der Urinproben (24h Sammelurin) erfolgte ebenfalls wie oben beschrieben, jedoch wurde der Waschvorgang mit 3 ml Acetonitril/ Wasser zweimal durchgeführt um v.a. adsorbiertes Billirubin von der Säule zu waschen.

#### 4.6.2 Kalibrierung der HPLC

Bis das System bereit zur Probenanalytik war, mussten zunächst reproduzierbare Standardchromatogramme und konstante Retentionszeiten erhalten werden. Hierzu wurde wiederholt 50 µl einer Standardlösung aus je 1.25 ng/µl CsA und CsD, sowie die einzelnen CM (1 ng/µl) injiziert. Nach mehreren fehlgeschlagenen Versuchen mit verschiedenen Eluenten, Chromatographiesäulen und Säulentemperaturen, stellten sich folgende Bedingungen mit Phenomenex<sup>®</sup> Säulen als optimal heraus:

Nr.	Säule	Maße [mm]	Eluent (MeCN/MeOH/H <sub>2</sub> O) (v/v/v)	T [°C]
1	Luna Phenyl-hexyl 5 $\mu$	150x4,6	200 / 80 / 140	75
2	Synergi Polar RP 4 $\mu$	150x4,6	200 / 20 / 140	75
3	Synergi Polar RP 4 $\mu$	150x4,6	A : 100 / 20 / 140	75
			B : 300 / 80 / 140	

Die Analyse erfolgte in der Regel mit der isokratischen Elution an der Phenylhexyl-Säule bei einem Fluss von 1 ml/min. Bei schlechter Auftrennung z.B. in Folge von Verunreinigungen etc. wurde auf das System mit dem Stufengradienten, mit folgendem Programm, zurückgegriffen :

[min]	%A	%B	Fluß [ml/min]
0 – 14.0	100 → 60	0 → 40	1
14.01 – 23.0	60	40	1
23.01 – 25.0	60 → 40	40 → 60	1
25.01 – 33.0	40	60	1
33.01 – 36.0	100	0	1

#### 4.6.3 Analyse der Proben

10 - 50 $\mu$ l des nach 4.6.1 erhaltenen Eluats wurden injiziert und die Substanzen bei 205 nm detektiert.. Nach Integration der Peaks wurde anhand der bekannten Konzentration des internen Standards CsD auf die Konzentrationen von CsA und dessen Metaboliten geschlossen

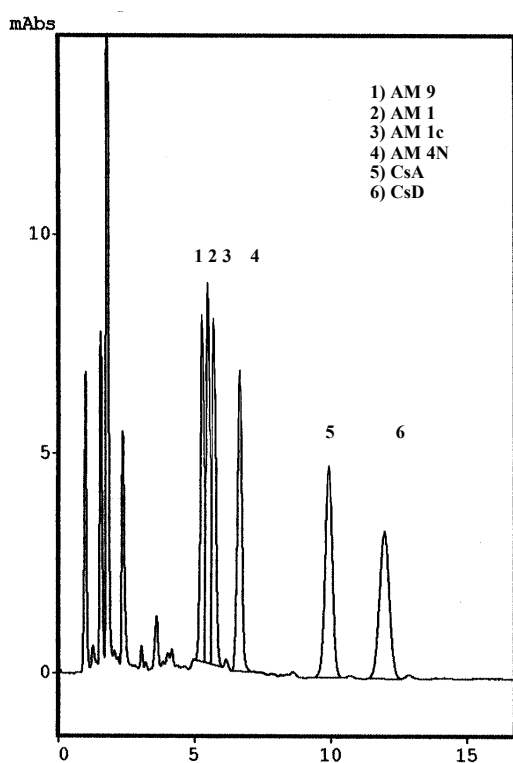
$$c\text{CsA [ng/ml]} = \frac{\text{Peakfläche Cyclosporin A}}{\text{Peakfläche Cyclosporin D}} \times 500 \text{ [ng/ml]}$$

$$\text{Umrechnung für Gewebeproben : } c\text{CsA [ng/g]} = \frac{\text{CsA [ng/ml]} \times 1 \text{ [ml]}}{\text{Probeneinwaage [g]}}$$

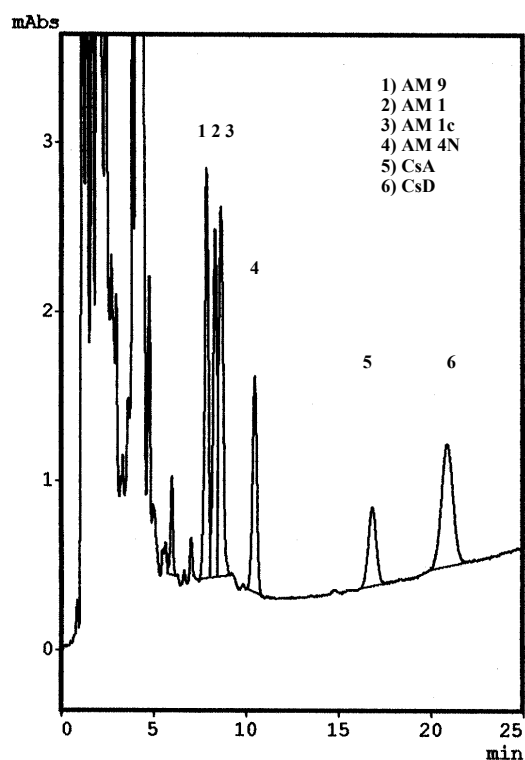
$$\text{WF} = \frac{\text{gemessene Menge CsD (ng)} \times \text{Elutionsvolumen (}\mu\text{l)}}{\text{zugegebene Menge CsD in Probe (ng)} \times \text{Inj.-Vol. Probe (}\mu\text{l)}}$$



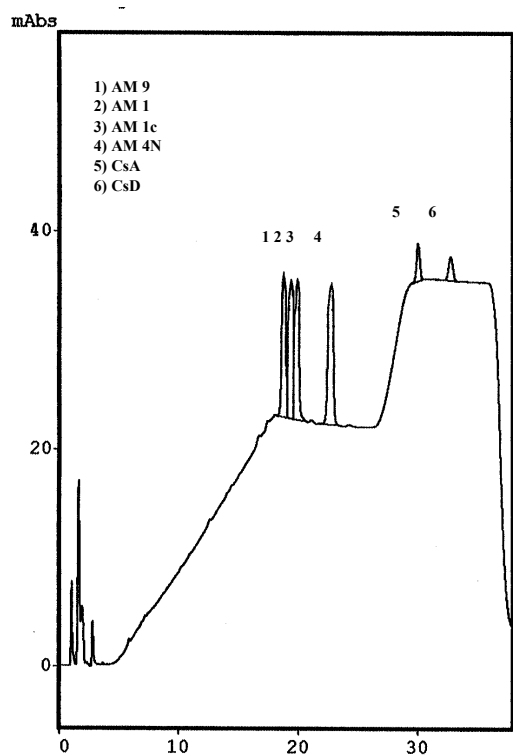
## Beispielchromatogramme :



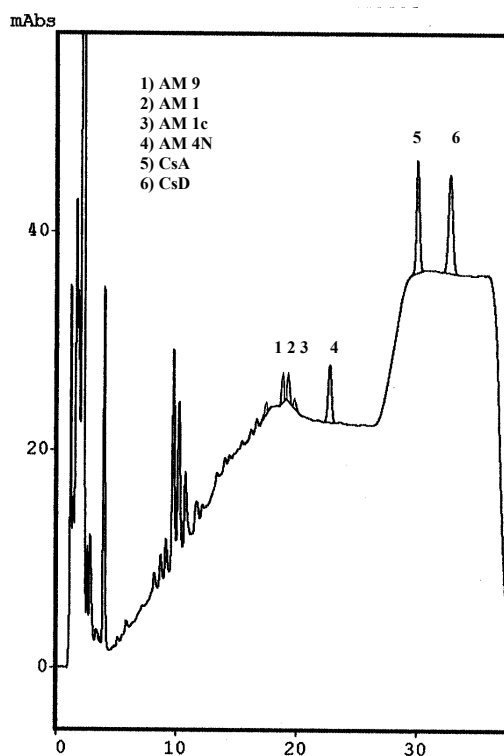
**Abb. 21** Standardchromatogramm des Metabolitenmixes bei isokratischer Elution.



**Abb. 22** Chromatogramm einer Nierenprobe einer Ratte nach 6 Wochen Sandimmun Neoral®



**Abb. 23** Standardchromatogramm des Metabolitenmixes bei Elution mit einem Stufengradienten



**Abb. 24** Chromatogramm einer humanen Blutprobe eines Patienten nach Nierentransplantation mit Sandimmun Neoral®

## 4.7 Histologie

Die Histologie von Nierenpräparaten (z.B. durch Biopsie) nach Nierentransplantation hat einen großen Stellenwert in der klinischen Beurteilung von Abstoßungsreaktionen.

### 4.7.1 Probengewinnung, –fixierung und Einbetten in Paraffin

Aus jeder Gruppe von Versuchstieren der Transplantationsversuch unter 4.2.1.2 wurde am Ende der Versuchsdauer jeweils eine Niere für die histologische Präparation verwendet. Die Niere wurde nach der Entnahme von der Kapsel befreit, mit einer Rasierklinge längs halbiert und sofort in 50 ml Methyl-Carnoy-Lösung (60% Methanol, 30% Chloroform, 10% Eisessig) fixiert. Die Carnoysche Flüssigkeit zeichnet sich durch ihr rasches Eindringen in das Gewebe aus, wobei sie nach ca. 4h bereits über 3mm tief eingedrungen ist. Der Chloroformzusatz bewirkt eine bessere Lipidlöslichkeit des Gemisches und erleichtert somit den anderen Komponenten die Penetration. Nach dem Fixieren kann die Probe in steigenden Konzentrationen bis hin zu absoluten Methanol dehydriert werden. Das stufenweise Erhöhen der Methanolkonzentration soll ein Zerreißen bzw. Schrumpfen des Gewebes durch zu schnelle Dehydratation verhindern. Das Überführen in ein Intermedium, z.B. absoluten Isopropanol nach der Alkoholreihe dient der Entfernung des Methanols und letzter Wasserreste bevor das Präparat in Paraffin eingebettet werden kann. Die Einbettung erfolgt in einer mit Paraffin gesättigten Lösung des Intermediums Isopropanol, indem das Präparat im Wärmeschrank (35-40°C) für ca. 30-60 min durchtränkt wird. Im Anschluß überführt man das Gewebe in reines, geschmolzenes Paraffin, wobei man das Paraffin mehrmals wechselt um ausgetretenen Isopropylalkohol zu entfernen. Jetzt kann das Präparat in eine Stahlform mit Paraffin ausgegossen werden und nach Erhärtung auf einem kleinen Holzblock montiert werden (Aufblocken).

### 4.7.2 Färben des Präparats und Immunohistochemie

Mit einem Mikrotom (Leitz SM 200R, Leica Instruments) wurden 4 µm dicke Scheiben geschnitten, mit der Messerseite auf einen Objektträger gelegt und durch gelindes Erhitzen auf 30-35°C mit Wasserzusatz geglättet und fixiert. Nach völligem Trocknen kann das Paraffin durch Eintauchen in Xylol entfernt werden.

Die histologischen Präparate wurden mit Hämalaun-Eosin (HE-Färbung) eingefärbt. Hämalaun ist ein positiv geladener Farbstoffkomplex aus Hämatein und einem  $\text{Al}^{3+}$ -Salz, der ganz allgemein dazu geeignet ist die Basophilie einer Struktur anzuzeigen. Es ist dadurch eine klassische Methode zur selektiven Einfärbung des Nucleus der Zellen, da sich der Farbstoffkomplex an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA bindet. Nach etwa 5- 8 min kann mit warmen Wasser gewaschen werden, wodurch die Blaufärbung hervortritt (Bläuen), und die Färbung gleichzeitig fixiert wird. Zur Gegenfärbung wird das Cytoplasma mit dem wasserlöslichen Triphenylmethan-Farbstoff Eosin Y gegengefärbt, danach in Wasser ausgewaschen und eingedeckt.

Des Weiteren wurden Nierenschnitte zur immunohistochemischen Detektion der COX-2 und des Renins verwendet. Die Farbreaktion beruht hier auf der Reaktion einer Peroxidase, die an einem für die o.g. Strukturen spezifischen monoklonalen Antikörper gebunden ist. Zunächst muss die endogene Peroxidaseaktivität durch Zusatz von 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 20 min bei Raumtemperatur blockiert werden, danach werden die Renin- oder COX-2 –Proteine mit einem primären monoklonalen Antikörper durch Inkubation über Nacht besetzt. Nach Zugabe des sekundären Antikörpers ( Verdünnung 1:200, Biotin-Konjugat eines Hasen anti-Ziegen IgG) und Inkubation mit einem Avidin D-Pferde-Meerrettich-Peroxidase Komplex, kann nach mehreren Waschgängen durch Zusatz von 0,02%-igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Peroxidquelle und Diaminobenzidin x 4 HCl die Farbreaktion ausgelöst werden. Alle derart gefärbten Schnitte wurden mit HE gegengefärbt.

Für die Detektion der COX-2 wurde ein kommerzielles Antiserum aus der Ziege in einer 1:200 Verdünnung verwendet (M-19, Santa Cruz Biotechnology). In früheren Untersuchungen wurde dargestellt, dass mit diesem Antiserum ausschließlich die induzierbare COX-2 detektiert wird und nicht die konstitutionelle COX-1.

## 5 Metabolismus des Cyclosporin A

### 5.1 Chemische Konstitution des Cyclosporin A und seiner Metaboliten

Das Cyclosporin A ist ein lipophiles (Octanol/Wasser-Koeffizient: 120:1) cyclisches Undecapeptid mit einem Molekulargewicht von 1202 Da. Es enthält eine einzigartige Aminosäure an Position, wobei es sich um einen Abkömmling des Threonins, das N-methyl-4-butenyl-4-methyl-threonin (MeBmt oder MBT), handelt. Diese Aminosäure stellt ein äußerst wichtiges Strukturmerkmal für die immunsuppressive Wirksamkeit des CsA dar. Experimentelle Veränderungen dieser Seitenkette, z.B. Verkürzungen, haben einen starken Wirkverlust zur Folge. Von den 11 Aminosäuren des Moleküls sind 6 N-methyliert und alle außer dem Alanin in Position 8 S-konfiguriert. Die Tertiärstruktur des CsA ist ein partielles  $\beta$ -Faltblatt. Die Metabolisierung des CsA beim Menschen erfolgt hauptsächlich über die Cytochromoxidase P450-III-A4 (CYP3A4), bei der Ratte CYP3A2, sowohl bereits in der Dünndarmmucosa als auch in der Leber. Somit unterliegt das CsA einem ausgeprägten first-pass Metabolismus, der jedoch in seiner Kapazität limitiert ist. Folglich hängt das Ausmaß des first-pass Metabolismus von der Resorptionsgeschwindigkeit des CsA direkt ab, wobei der Galenik der verwendeten Arzneiform eine entscheidende Rolle zukommt.

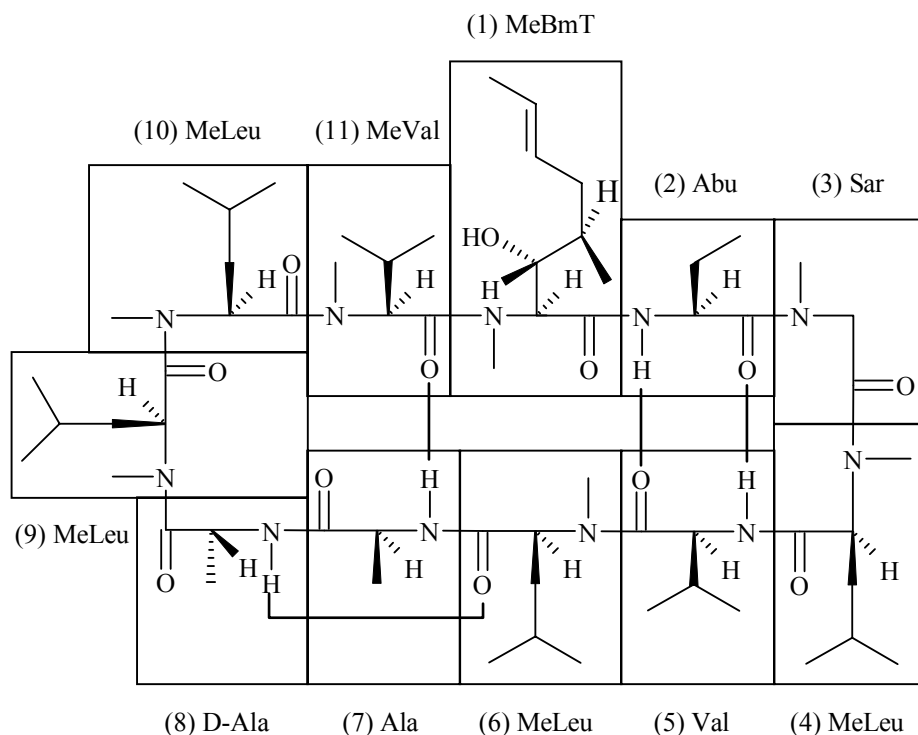
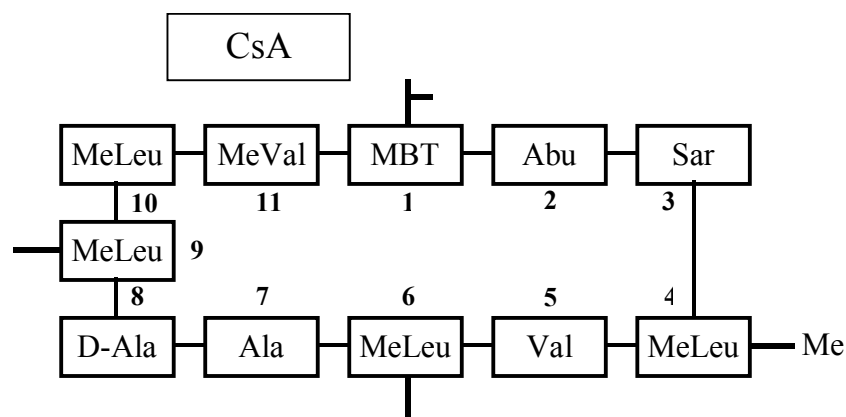


Abb. 25 Struktur des CsA: Darstellung der einzelnen Aminosäuren



**Abb. 26** Schematische Darstellung der Hauptmetabolisierungspunkte des CsA

Die cyclische Struktur des CsA bleibt bei allen Metaboliten vorhanden, zudem sind die metabolischen Veränderungen des CsA minimal. So treten bei den Primärmetaboliten nur relativ geringfügige Veränderungen auf,  $\gamma$ -Hydroxylierungen an den Aminosäuren 1, 4, 6, 9 sowie N-Demethylierung an AS 4. Die Metaboliten, sowie auch das CsA selbst unterliegen einem enterohepatischen Kreislauf, wobei die biliäre Elimination den Hauptweg der Ausscheidung darstellt. Erstaunlicherweise ist bislang nur ein Phase-II-Metabolit bekannt, das AM1c-Glucuronid, alle anderen Metaboliten werden unkonjugiert v.a. biliär, aber z.T. auch renal eliminiert. Etwa 6% der bioverfügbaren CsA Dosis erscheint unverändert im Urin.

## 5.2. Nomenklatur und Klassifizierung der CsA Metaboliten

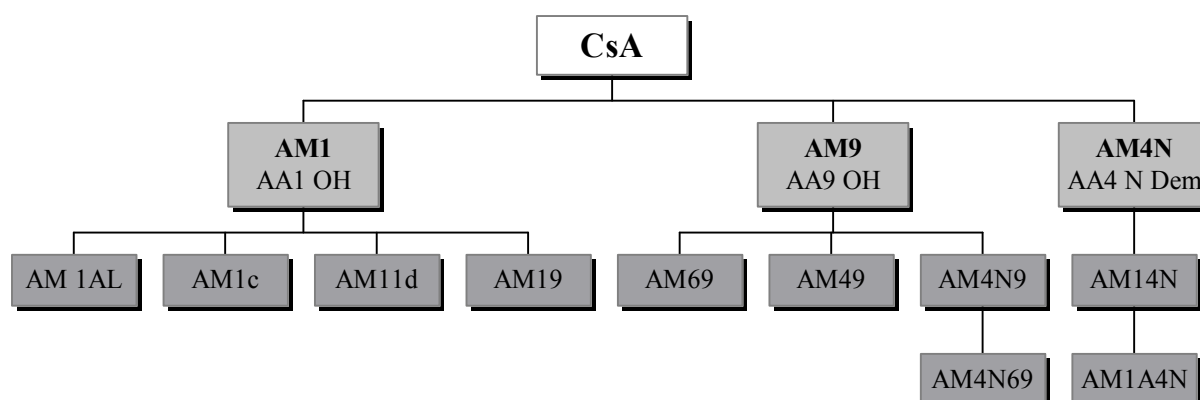
Bislang wurden mehrere verschiedene Nomenklatorsysteme für die Metaboliten des CsA vorgeschlagen (*Christians et al., 1988, Lacerda et al., 1995*). Letztendlich hat sich die Variante von Wenger et al. durchgesetzt, die logisch auf der jeweiligen strukturellen Molekülveränderung aufbaut, die sog. AA-Nomenklatur. Die bis dato verwendete M-Nomenklatur, d.h. Metaboliten werden nach der Reihenfolge ihrer Genese beziffert z.B. M19, M21 etc. war unlogisch und nicht praktikabel.

Die AA-Nomenklatur bezeichnet zunächst die vom Metabolisierungsschritt betroffene(n) Aminosäuren (AA = amino acid) mit ihrer Position im CsA Molekül. Erfolgt kein weiterer Zusatz, so handelt es sich um Hydroxylierungen der betreffenden Aminosäure (bevorzugt am  $\gamma$ -C), z.B. AM9. Bishydroxylierte Produkte werden einfach durch Auflistung der betreffenden Aminosäuren bezeichnet, so z.B. AM19.

Bei N-Demethylierungen wird hinter der entsprechenden Aminosäure ein "N" gestellt, z.B. AM4N. Weitere Buchstaben sind z.B. "AL" oder "A" für eine Oxidation bis zu einer Aldehyd- bzw. Carbonsäurefunktion. Generell lassen sich strukturell 3 Hauptgruppen von Metaboliten unterscheiden, nämlich Metaboliten, die sich vom AM1, AM9 oder vom AM4N ableiten.

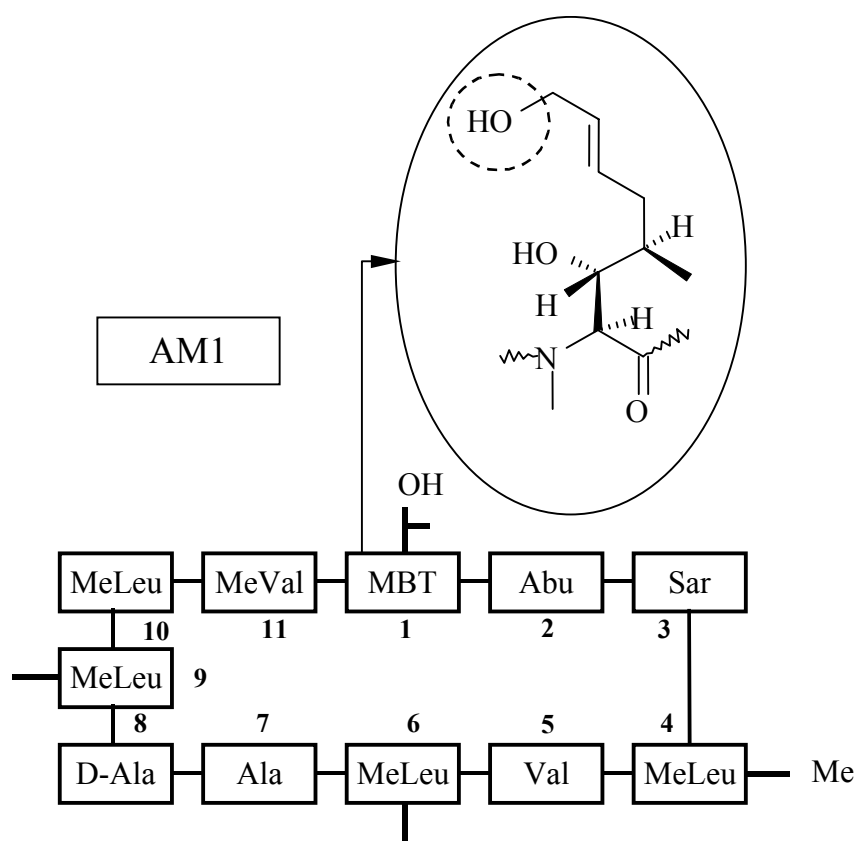
Die im folgenden verwendete, oben gezeigte schematische Abbildung des CsA enthält die Positionen, die bevorzugt metabolisiert werden: Die Demethylierung an Position (4) sowie  $\gamma$ -Hydroxylierungen an den Positionen 1, 6, 9, zudem tritt recht häufig eine

Cyclisierung des Restes der AA 1 (MeBmT) ein (= AM1c). Es wurden über 40 verschiedene Metaboliten postuliert, jedoch gilt bisher nur die Existenz folgender Metaboliten in vivo als gesichert:

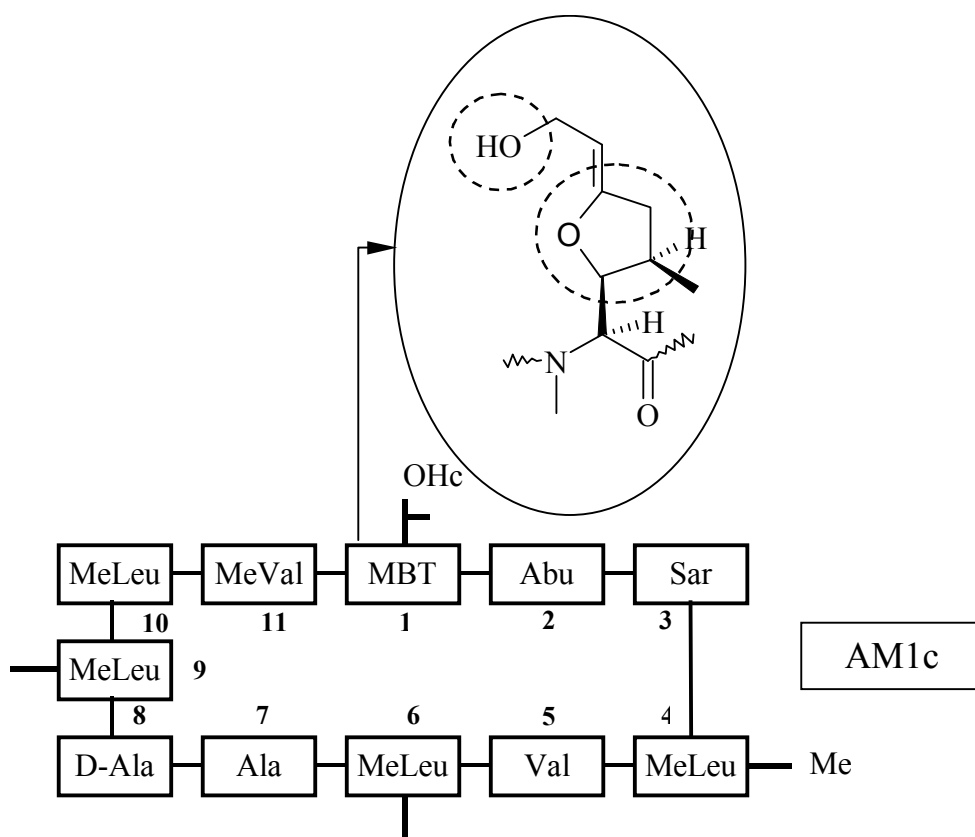


**Abb. 27** Schema der Genese der wichtigsten Primärmetaboliten des CsA

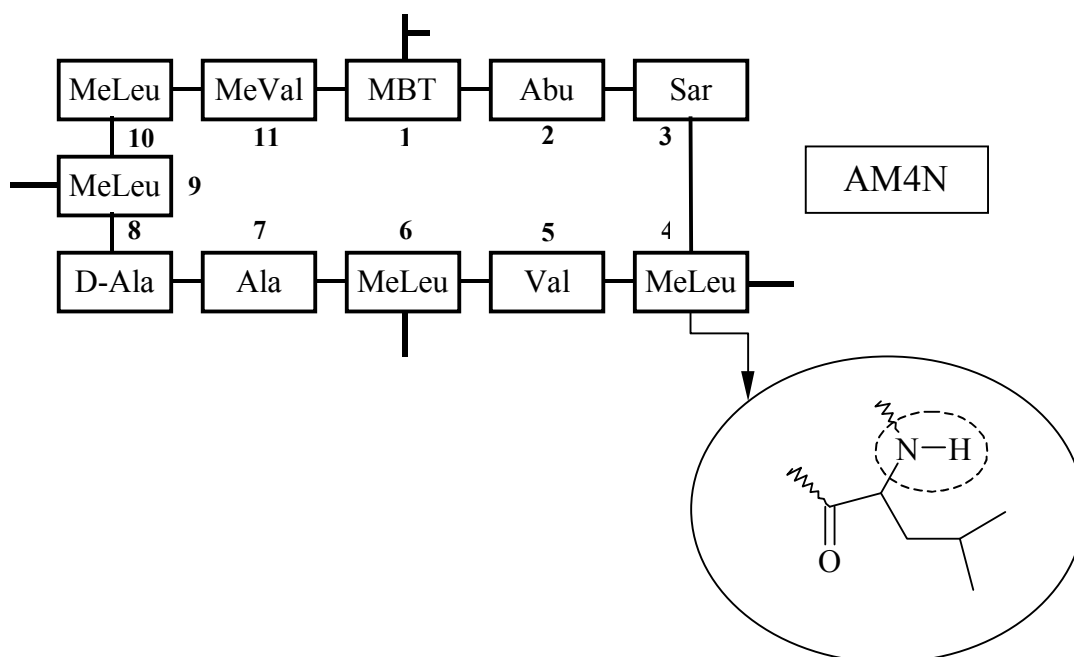
Die Gehalte folgender Metaboliten wurden in dieser Arbeit bestimmt :



**Abb. 28** AM1: Hydroxylierung des endständigen C-Atoms der AA 1



**Abb. 29** AM1c: wie AM1 (Abb.28), zusätzlich Cyclisierung in der Seitenkette zu einem THF Rest



**Abb. 30** AM4N: N- Demethylierung an der AA 4

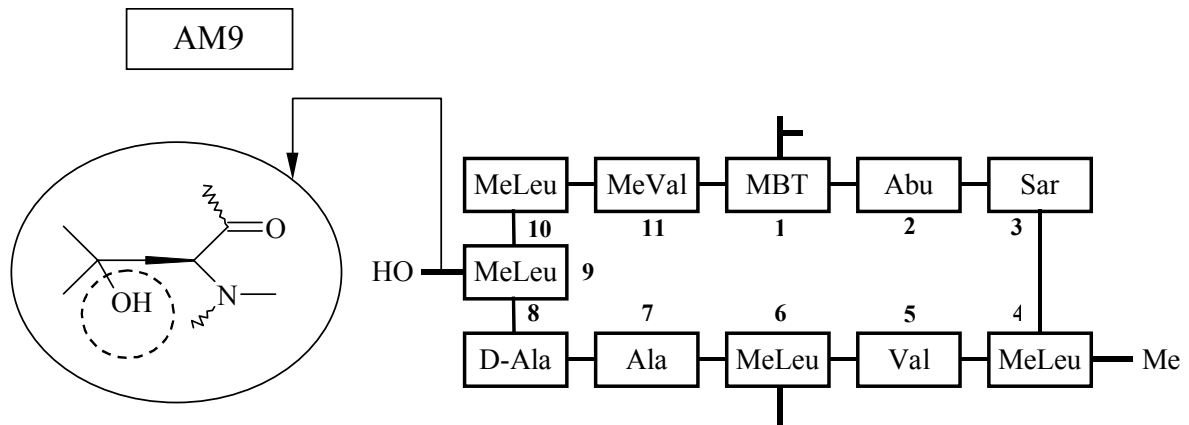


Abb. 31 AM9: Hydroxylierung der Seitenkette der AA9

### 5.3. Die Bildung und Verteilung der CsA Metaboliten

Die Familie der Cytochrom P450 Oxidasen ist verantwortlich sowohl für den Metabolismus vieler Xenobiotika als auch endogener Substanzen. Enzyme mit einer Homologie ihrer Aminosäuren von mehr als 40% gehören zu einer Familie, diejenigen mit über 55% Homologie zu einer Unterfamilie. Es sind zahlreiche Interaktionen auf der Ebene dieser Enzyme bekannt, z.B. Induktion des P450 Systems durch Barbiturate oder Blockade z.B. durch Rifampicin. Anzumerken ist eine große strukturelle Bandbreite an den metabolisierbaren Substanzen. *Kronbach et al.* konnten zeigen, dass das CsA vorwiegend über die P450 3A Unterfamilie abgebaut wird. Beim Menschen kommen dafür das P450 3A3, 3A4 und 3A5 in Frage. Jedoch sind auch noch andere Enzymsysteme am Abbau des CsA beteiligt, so z.B. Flavin enthaltende Monooxygenasen, die v.a. für die Bildung des AM1c (Cyclisierung !) verantwortlich gemacht werden, wobei noch unklar ist, ob die  $\gamma$ -Hydroxylierung der AA1 eine Voraussetzung für die Cyclisierung ist, oder ob sie erst im Anschluss erfolgt. Gemeinhin wird das Auftreten der AA1c Metaboliten als alternativer Stoffwechselweg des CsA bezeichnet. Die Cyclisierung könnte auch nicht-enzymatisch erfolgen, jedoch zeigt der isolierte Metabolit AM1 in vitro keine spontane Ringbildung, auch wurde bisher noch kein an AA1 „cyclisiertes CsA“ gefunden. Diskutiert werden des Weiteren die Bildung reaktiver Intermediate und die Bindung an Makromoleküle, welche beide zur Bildung von cyclisierten Metaboliten führen könnten. Interessant ist auch die Verteilung des CsA und dessen Metaboliten im Organismus: CsA bindet beinahe ausschließlich an das Cyclophilin A, welches auch in Erythrocyten vorkommt, in denen das CsA vollständig gebunden vorliegt. Eine entscheidende Rolle kommt hier den AA 1, 4, 6 und 9 zu, über die anscheinend die Bindung zum CYP A zustande kommt. Einfache Veränderungen wie Hydroxylierung beeinflussen das Bindungsverhalten nicht, jedoch Oxidationen an diesen AA bis hin zur Aldehyd- oder Carbonsäurefunktion, aber auch Cyclisierung an AA1 verhindern diese Bindung. Dies ist auch der Grund für das vollständige Fehlen von cyclisierten Metaboliten in den Erythrocyten, dagegen aber sind relativ hohe Konzentrationen im Urin vorhanden. Folglich ist wahrscheinlich auch die restliche



Pharmakokinetik der cyclisierten Metaboliten anders als die des CsA und der anderen Metaboliten.

#### 5.4 Toxizität des CsA und der Metaboliten

Das Gebiet der Mechanismen der Toxizität des CsA und dessen Metaboliten ist nach wie vor ein weitgehend unbekanntes Terrain. Alle bisher erhobenen Daten sind in vitro Versuchen mit beinahe ausschließlich Rattenzelllinien entnommen, zumal bekannt ist, dass der Mensch zu den CsA empfindlichsten Spezies zählt. Diese Ergebnisse können folglich nur mit größter Zurückhaltung auf den Menschen übertragen werden. Im Vordergrund der klinischen Debatte über die Toxizität des CsA steht die Nephrotoxizität. Verschiedene Zellkulturversuche mit renalen Epithelzellen, Mesangialzellen und Zellen des proximalen Tubulus haben im Großen und Ganzen eines gezeigt : die ausgeprägteste Wirkung in Bezug auf eine Hemmung der Protein-, DNA- und RNA- Synthese, sowie auf die Proliferation der Zellen zeigte mit Abstand das CsA selbst, gefolgt von AM4N und AM1c u.a. (*Radeke et al.*). Inwieweit jetzt eine Hemmung z.B. der Proliferation der Mesangialzellen der Ratte in vitro mit einer nierenschädigenden Wirkung beim Menschen in vivo in Relation gesetzt werden kann ist jedoch fraglich. Weiterhin zeigte auch die isolierte parenterale Gabe verschiedener Metaboliten an der Ratte keinen Hinweis auf Schäden der Niere (*Donatsch et al.*).

Wesentlich interessanter hingegen sind Untersuchungen bezüglich der Freisetzung vasoaktiver Substanzen, wodurch die renale Hämodynamik deutlich verändert werden könnte (*Copeland et al.*). CsA und AM4N reduzieren die ET-1 Bildung in einer Kultur von Mesangialzellen, wohingegen AM1c9 sie stark erhöht. Tatsächlich findet man in vivo eine Zunahme der ET-1 Sekretion, jedoch kann man sie kaum auf AM1c9 zurückführen, da dieser CM in vivo in den allermeisten Fällen in Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze vorliegt. Die in der Zellkultur verwendete Konzentration dieses Metaboliten entspricht dem 1000-fachen der in vivo praktisch kaum messbaren Konzentration dieses Metaboliten. Es gab bisher mehrere klinische Studien mit der Intention den Zusammenhang von CsA Metaboliten und Nephrotoxizität aufzuklären, jedoch mit mäßigem Erfolg. Etwa die Hälfte dieser Studien fand einen Zusammenhang, die andere Hälfte nicht. Die Autoren Kunzendorf et al. fanden sogar sehr hohe Metabolitenspiegel bei nierentransplantierten Patienten, die frei von Abstoßungsreaktionen waren und niedrige Spiegel bei Abstoßungsepisoden. Erst später, bei genauerer Analyse der Studiendaten wurde eines deutlich: Ein Teil der Studien wurden mit einem mehr oder weniger spezifischen Radioimmunoassay durchgeführt, aufgrund dessen Ergebnisse oft ein Zusammenhang von Metaboliten mit Nephrotoxizität postuliert wurde. Studiendaten, die mit einer HPLC Messung erhoben wurden führten in der Regel nicht zu derartigen Schlüssen.

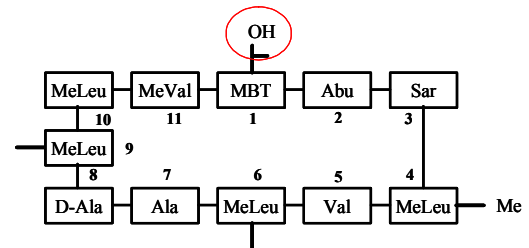
Zusammenfassend gesehen existieren viele Widersprüche und Gegensätze bezüglich der Rolle und des Mechanismus des CsA und seiner Metaboliten hinsichtlich nephrotoxischer Wirkungen. Auch die Datenlage hierzu ist zu unvollständig, um auch nur eine ungefähre Linie erkennen zu können.

## 6 Ergebnisse

► Zu Beginn des Kapitels der Ergebnisse sollen die einzelnen CsA Metaboliten zur Erleichterung des Verständnisses noch einmal kurz dargestellt werden (s. **Kapitel 5**). Der für die Metabolisierung zuständige Enzymkomplex (Cytochrom P450) ist CYP3A2 bei der Ratte bzw. CYP3A4 beim Menschen.

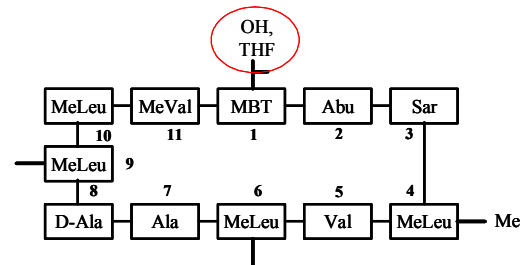
### AM1

Bei diesem Metabolisierungsschritt wurde die AS 1 (N-methyl-4-butenyl-4-methyl-threonin = MBT) am  $\gamma$ C-Atom hydroxyliert.



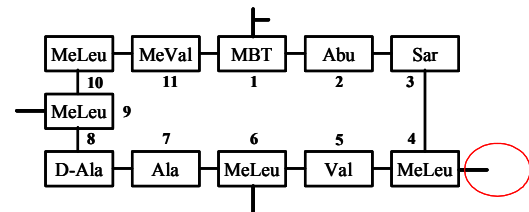
### AM1c

Bei diesem Metaboliten ist ebenfalls die AS 1 hydroxyliert und zusätzlich deren Seitenkette zu einem Tetrahydrofuran (THF) Rest cyclisiert.



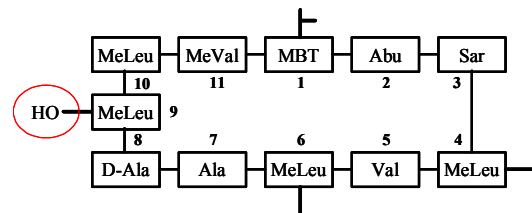
### AM4N

Dieser Metabolisierungsschritt, die Abspaltung der N-Methylgruppe der AS 4 (Methyl-Leucin) passiert vornehmlich in der Darmmucosa.



### AM9

Die AS 9, wiederum am  $\gamma$ C-Atom der Seitenkette, ist bei diesem Metaboliten das Ziel der Hydroxylierung.

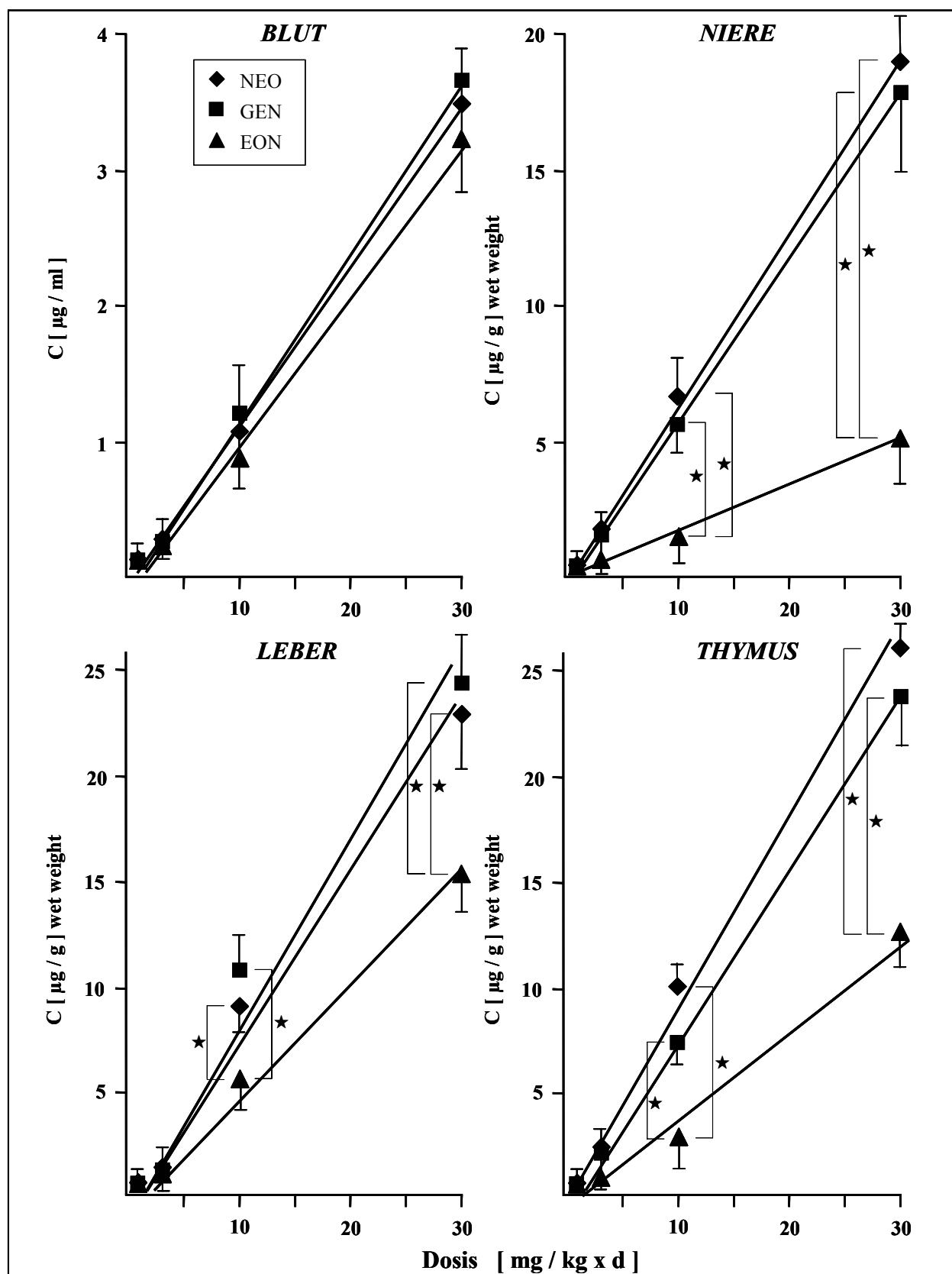


► Die grafische Darstellung der Ergebnisse ist v.a. bei den Transplantationsversuchen sehr komplex, da hier bis zu 10 verschiedene Gruppen miteinander verglichen werden. Um die Signifikanzen so übersichtlich wie möglich darzustellen wurden die sich

signifikant unterscheidenden Gruppen mit einer Klammer (  $\overline{\hspace{1cm}}$  ) zusammengefasst und mit kleinen Buchstaben im Diagramm und im Text markiert, um die nachgewiesenen Unterschiede besser hervorzuheben. Bei Verwendung von einzelnen Symbolen zur Darstellung der jeweiligen Signifikanzen, wären sehr viele Zeichen nötig geworden, wodurch die Arbeit unübersichtlich geworden wäre.

## 6.1 Dosislinearität und dosisabhängige Metabolisierung des CsA

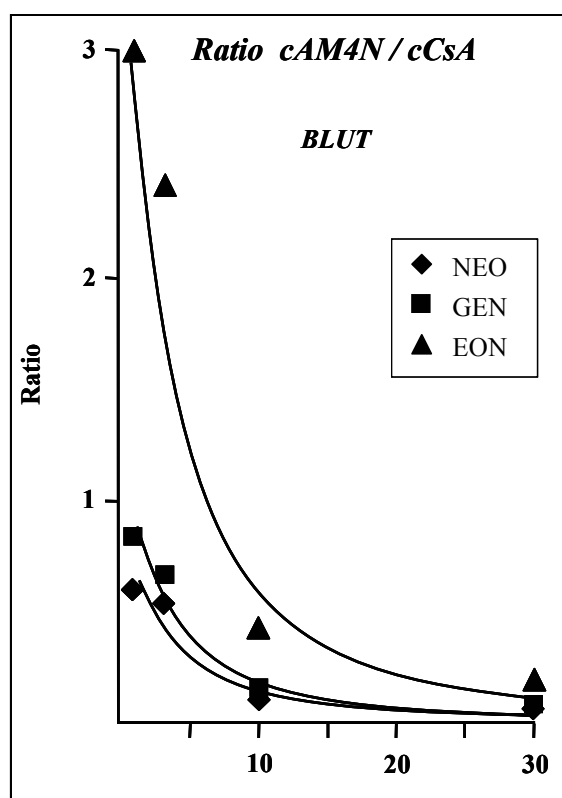
### 6.1.1 Dosislinearität des CsA im Vollblut, Nieren-, Leber- und Thymusgewebe



**Abb.32** Darstellung der Dosislinearität des CsA im Vollblut und Organen im steady-state ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ,  $\star p < 0.05$ )

In allen Organen sowie im Blut stellte sich bei Neoral und Gengraf eine vergleichbare Dosislinearität ein (Abb.32). Zwar war die Dosislinearität bei Eonlabs auch gegeben, jedoch unterschied sie sich, außer im Blut, signifikant von den anderen beiden Medikamenten.

### 6.1.2 Verhältnisse der Konzentrationen der Talspiegel der Cyclosporin Metaboliten zu den Konzentrationen des Cyclosporin A bei verschiedenen Dosierungen



**Abb.33** Dosisabhängige Bildung von AM4N. Darstellung des Verhältnisses des Gehaltes an AM4N zur CsA Konzentration im Vollblut (steady-state, n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ).

Die Abhängigkeit des Ausmaßes der Bildung der Metaboliten des CsA von der Dosis im Darm oder in der Leber ist bereits mehrfach beschrieben worden (*Brunner et al., 2000*). Zum Vergleich Neoral, Gengraf und Eonlabs kann man in allen Organen, sowie im Blut eine deutlich stärkere Metabolisierungsrate bei Eonlabs erkennen. Dargestellt ist hier das Verhältnis der AM4N Konzentration zur CsA Konzentration bei den Dosierungen 1, 3, 10 und 30 mg/kg\*d im steady-state im Vollblut. Auf die Darstellung der weiteren Metaboliten, sowie den Organen ist hier verzichtet worden, da sich im Wesentlichen dasselbe Bild darstellen lässt.

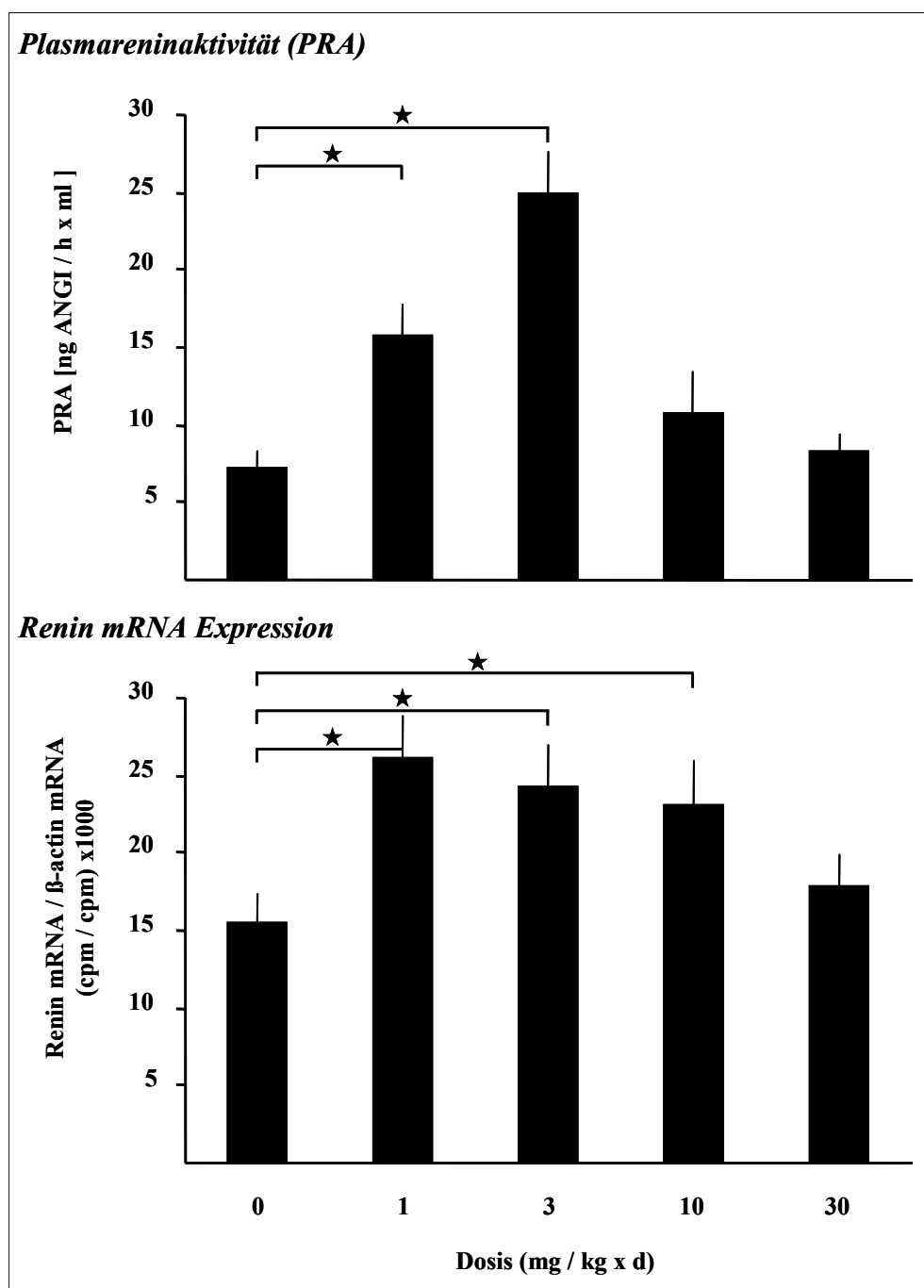
Allgemein ist bei niedrigen Dosierungen (1, 3 mg/kg\*d) die Metabolisierung stärker ausgeprägt, verglichen mit höheren Dosierungen (10, 30 mg/kg\*d). Im Falle der niedrigeren Dosierungen kann man bei Eonlabs mehr als 3-fach höhere Metabolisierungsraten feststellen als bei den beiden anderen Medikamenten. Eine mögliche Erklärung könnte eine schlechtere bzw. langsamere Resorption des CsA aus der Eonlabs Formulierung und eine damit verbundene intensivere first-pass Metabolisierung im Vergleich zu Neoral bzw. Gengraf sein, die sich nicht voneinander unterscheiden.

### 6.1.3 Dosis-Wirkungsbeziehungen des CsA (nur Neoral) auf verschiedene Genexpressionen in der Niere

Diese Versuchsreihe, die 2 Wochen dauerte, diente auch der Ermittlung dosisabhängiger Effekte des CsA (nur Neoral) auf die mRNA Genexpression des Renins, der

Cyclooxygenasen -1, -2 (COX-1, -2), der Endotheline -1, -3 (ET-1, ET-3), der Endothelinrezeptoren (ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>), sowie der Hypertrophiemarker Kollagen-1, -3 und Fibrinogen in der Niere.

#### 6.1.3.1 Dosis-Wirkungsbeziehung des CsA auf die Reninsynthese und mRNA Genexpression:



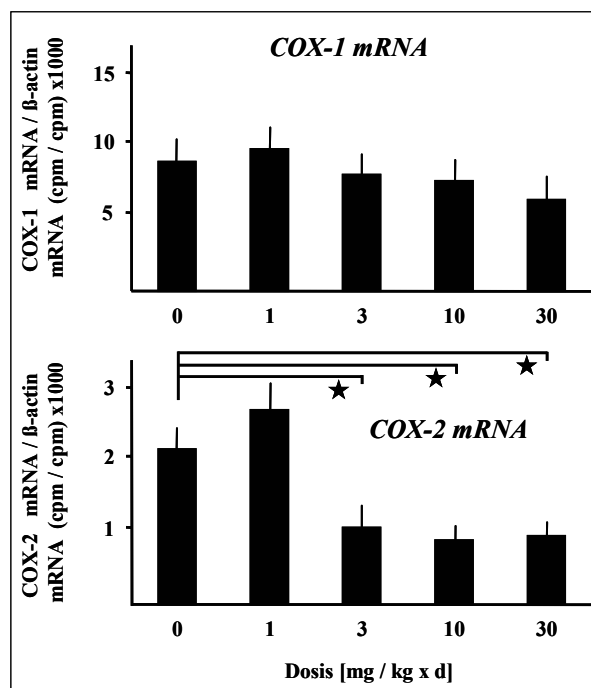
**Abb.34** Darstellung der Plasmareninaktivität (PRA) und der Renin mRNA Expression im Nierengewebe (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , ★ p< 0.05)

Eine Stimulierung der PRA war nur bei den Dosierungen 1 und 3 mg/kg\*d nach 2 Wochen erkennbar. Dagegen zeigt die mRNA Expression des Renins zusätzlich

signifikante Erhöhungen gegenüber den Kontrolltieren bei einer Dosierung von 10 mg/kg\*d.

#### 6.1.3.2 Dosis-Wirkungsbeziehungen des CsA auf die COX-1 und -2 mRNA Genexpression in der Niere

CsA hatte keinen Einfluss auf die COX-1 Abundanz in den Nieren nach 14-tägiger Applikation. Im Gegensatz dazu war die Expression der COX-2 ab einer Dosierung von 3 mg/kg\*d im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erniedrigt. Innerhalb der Erniedrigungen war kein dosisabhängiger Effekt erkennbar.



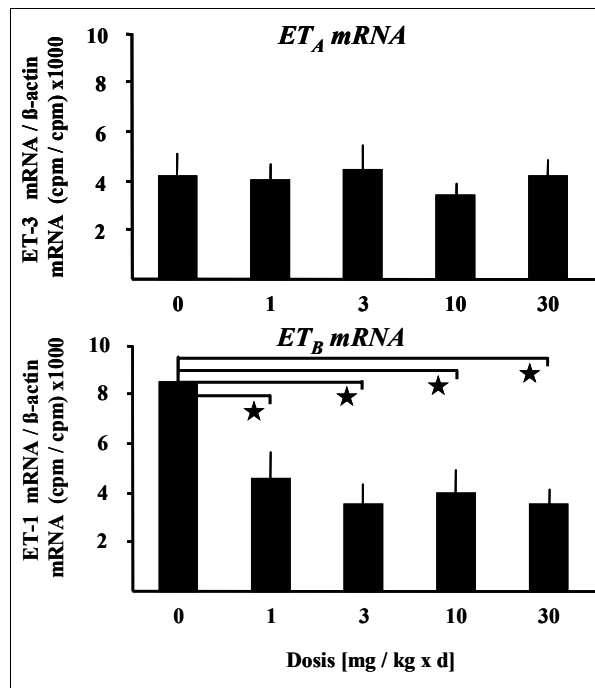
**Abb.35** Darstellung der COX-1 und COX-2 mRNA Expression im Nierengewebe (n = 6, x ± SEM, ★ p < 0.05)

#### 6.1.3.3 Dosis-Wirkungsbeziehung des CsA auf die ET und ET-Rezeptoren mRNA Genexpression in der Niere

Hinsichtlich der ET-1 und ET-3 mRNA konnten keinerlei Abweichungen von den mRNA Daten der Kontrollratten festgestellt werden (nicht dargestellt). Die Expression der ET- Rezeptoren dagegen wurde durch CsA verändert (Abb.36). Während die mRNA Werte des ET<sub>A</sub> Rezeptors unverändert blieben, wurde die Expression der ET<sub>B</sub> mRNA schon ab einer Dosierung von 1 mg/kg\*d signifikant erniedrigt. Alle anderen Dosierungen riefen dasselbe Ausmaß an Reduzierung hervor.

#### 6.1.3.4 Dosis-Wirkungsbeziehung des CsA auf die Kollagen-1, -3 und Fibrinogen mRNA Genexpression

Die Gabe des CsA konnte in keiner Dosierung die Expression der mRNA der Kollagene 1 und 3 sowie des Fibrinogens innerhalb von 2 Wochen verändern (nicht dargestellt).



**Abb.36** Darstellung mRNA Expression der ET Rezeptoren A und B im Nierengewebe (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , ★  $p < 0.05$ )

✓ Zusammenfassung der Ergebnisse der Dosis- Wirkungsbeziehungen (nach 2 Wochen):

- Die Dosislinearität war in allen untersuchten Körpergeweben bei allen galenischen Formulierungen gegeben. Die Eonlabs Formulierung wich nur im Blut nicht ab vom Ausmaß der Dosislinearität verglichen mit Neoral und Gengraf. In allen untersuchten Organen war das Ausmaß der Dosislinearität der Eonlabs Formulierung signifikant erniedrigt.
- Der Grad der Metabolisierung des CsA war stark dosisabhängig, insbesondere bei der AM4N Bildung. Die Eonlabs Formulierung führte zu einer intensiveren Metabolisierungsrate im Dosierungsbereich von 1- 10 mg/kg\*d.
- Die Plasmapreninaktivität (PRA) nahm bei den Dosierungen 1 und 3 mg/kg\*d dosislinear zu, blieb aber bei 10 und 30 mg/kg\*d unverändert verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren
- Die Expression der Renin mRNA stieg am stärksten bei der niedrigsten Dosierung an und fiel danach wieder ab, so dass bei der höchsten Dosierung kein signifikanter Unterschied mehr zu den Kontrolltieren bestand.
- Die mRNA Expression der COX-1 blieb bei allen Dosierungen unverändert, die mRNA Expression der COX-2 dagegen fiel ab einer Dosierung von 3 mg/kg\*d signifikant ab.
- Die Expression der ET<sub>A</sub> Rezeptoren in den Nieren blieb unbeeinflusst, die mRNA Abundanz des ET<sub>B</sub> Rezeptors hingegen nahm schon bei einer Dosierung von 1 mg/kg\*d signifikant ab.

## 6.2 Vergleichende Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und des Metabolismus des Cyclosporin A an nierentransplantierten Ratten

Bei der Darstellung der Ergebnisse der Transplantationsversuche werden folgende Abkürzungen und Gruppenbezeichnungen verwendet (s.a. 4.2.2).

<u>MK</u>  NEO, GEN, EON	Medikationskontrollen; diese Gruppen erhielten über die Versuchsdauer (6 Wochen) nur das jeweilige Medikament in der Dosierung 10 mg/kg*d NEORAL, GENGRAF, EONLABS
<u>OPK</u>  UNX, UNX+  ITX, ITX+	<u>OP Kontrollen</u> ; die Tiere in diesen Gruppen dienten zur Erfassung der OP bedingten Beeinflussung und Schädigung der Nieren, sowie des CsA Metabolismus  Unilateral nephrektomierte Ratten, UNX+: mit Medikation (nur NEORAL 10 mg/kg*d)  Unilateral isotransplantierte Ratten, zusätzlich wurde die andere native Niere ektomiert. ITX+ : wiederum mit Medikation (nur NEORAL 10 mg/kg*d)
<u>TX</u>  TXNEO TXGEN TXEON  TXL, NEO L	Unilateral allotransplantierte Ratten, beide native Nieren wurden entfernt.  Diese 3 Gruppen bekamen die jeweiligen Medikamente NEORAL, GENGRAF, EONLABS in der Dosierung 10 mg/kg*d.  Um die TX Gruppen mit einem „worst case“ zu vergleichen, wurden noch 2 Gruppen benötigt. <b>TXL</b> : Unterdosierte (L=low dose) allotransplantierte Ratten, die nur <u>1 mg/kg*d NEORAL</u> bekamen. <b>NEO L</b> ist hierfür wiederum die Medikationskontrolle, d.h. diese Tiere bekamen <u>nur</u> das Medikament (1 mg/kg*d NEORAL) über 6 Wochen.
C <sub>0</sub>  C [µg / g] oder [µg / ml] oder cCsA	Talspiegel (= trough-Spiegel) des CsA oder der Metaboliten 24h nach der letzten Gabe jeweils im Vollblut und in den Organen  Konzentration des CsA und der Metaboliten im Gewebe und im Vollblut
CM	CsA Metaboliten
W	Wochen

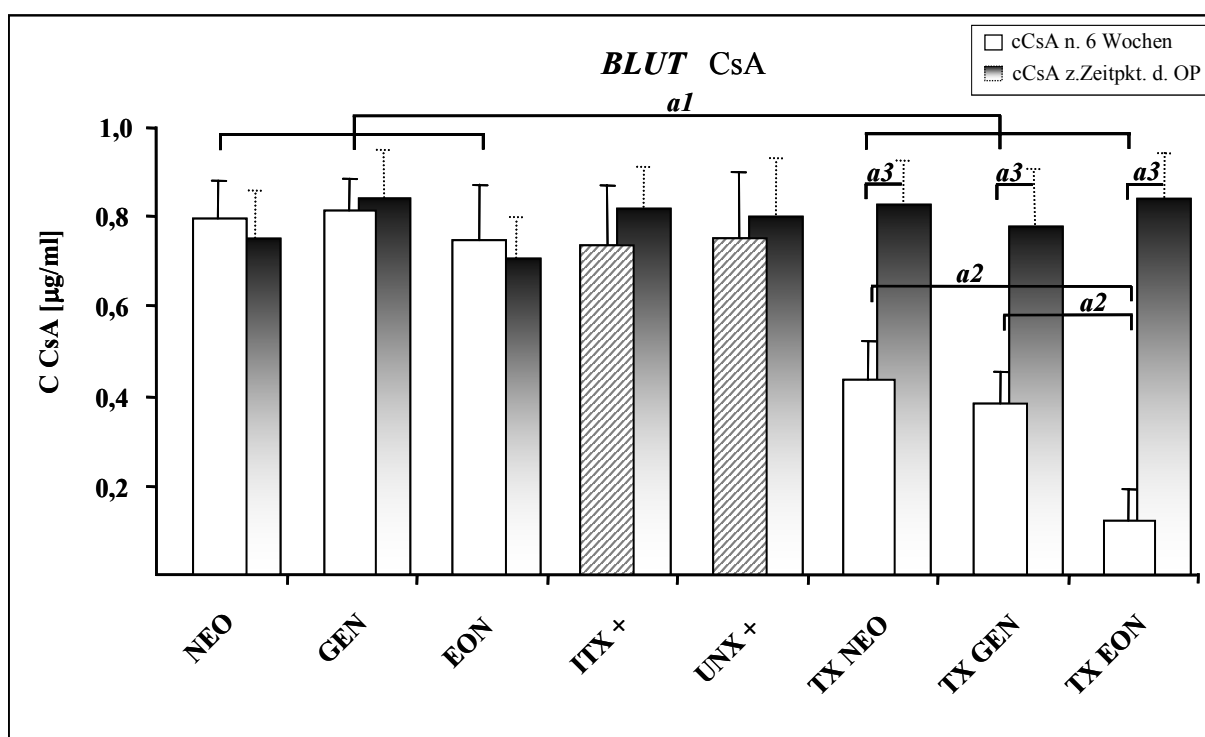


## 6.2.1 C<sub>0</sub>- Werte des CsA und der CsA Metaboliten (CM) in verschiedenen biologischen Matrices

### 6.2.1.1 Talspiegel des CsA und der CM im Vollblut

#### ► C<sub>0</sub> CsA Vollblut:

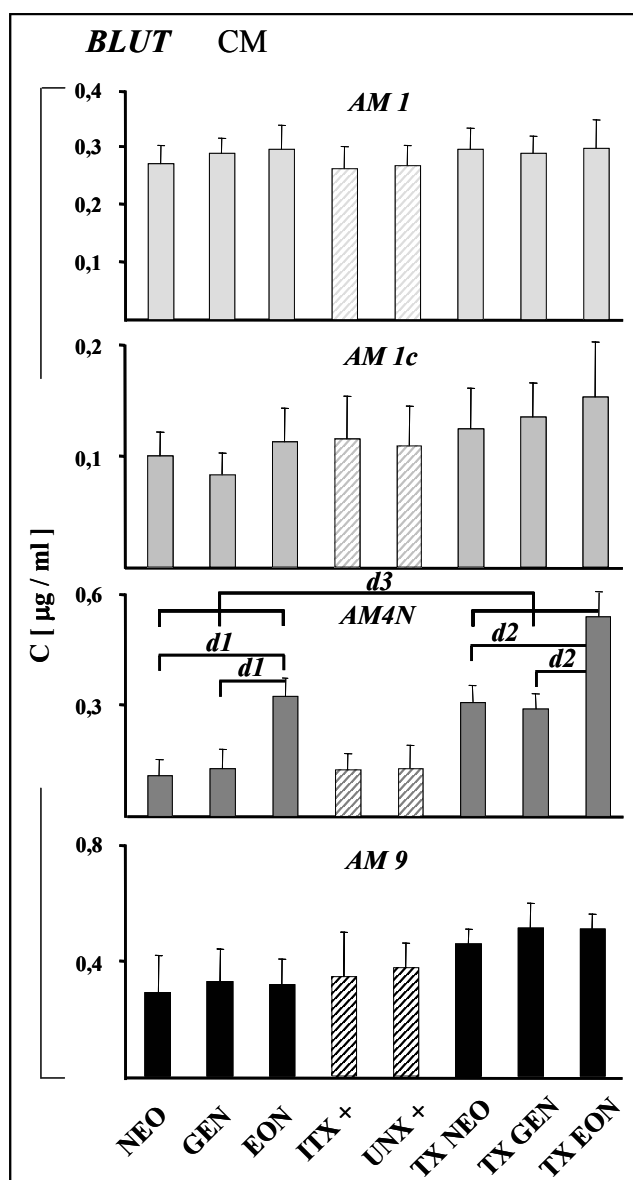
Die Talspiegel (trough concentration) des CsA waren in den Allotransplantationsgruppen (TX) im Vergleich zu den Medikationskontrollen (MK) nach 6 Wochen signifikant erniedrigt (**a1**). Innerhalb der TX Gruppen zeigten die TXEON Tiere im Vergleich zu TXNEO bzw. TXGEN eine zusätzliche Absenkung des Trough-Wertes (**a2**). Eine weitere Beobachtung war in diesem Zusammenhang die Bestätigung der geringeren Bioverfügbarkeit des CsA nach TX, da dieselben Ratten (TX Gruppen) zum Zeitpunkt der OP etwa um 100% höhere Talspiegel besaßen als nach 6 Wochen (**a3**). ITX+ und UNX+ waren im Hinblick auf CsA konform mit den Medikationskontrollen, so dass eine Auswirkung des Isotransplantats, sowie der unilateralen Nephrektomie, jeweils mit Medikation, auf C<sub>0</sub> CsA ausgeschlossen werden kann. Es traten daher dieselben signifikanten Unterschiede zwischen ITX+ bzw. UNX+ und den TX Gruppen auf (nicht eingezeichnet).



**Abb. 37** C<sub>0</sub> CsA der TX, MK und OPK zu Beginn und am Ende der Versuchsreihe im Vollblut der Ratten. Die dunklen Balken im Hintergrund stellen die CsA Werte zum Zeitpunkt der Operation dar. Die weißen Balken zeigen die CsA Werte der MK- und TX Gruppen, die quergestreiften Balken die der OPK 6 Wochen später dar (n = 8, x ± SEM, **a** p < 0.05)

► C<sub>0</sub> CM Vollblut:

Im Vollblut veränderten sich hinsichtlich des Profils der CsA Metaboliten nur die Talspiegel von AM4N. Nach Allotransplantation erhöhten sich die AM4N Gehalte bei allen Tieren signifikant (*d3*). Auch waren innerhalb dieser Gruppen sowohl die AM4N Spiegel der TXEON Gruppe (*d2*), als auch der EON Gruppe (*d1*) signifikant höher als bei den jeweiligen anderen Gruppenmitgliedern. Die CM Werte der ITX+ und UNX+ sind wiederum nicht verschieden von denen der MK, mit Ausnahme von EON (nicht eingezeichnet). Folglich bestehen zwischen den OPK und den TX Gruppen die gleichen Unterschiede wie zwischen MK und TX (nicht eingezeichnet).



**Abb. 38** C<sub>0</sub> CM der TX, MK und OPK im Vollblut nach 6W. Die OPK sind jeweils in quergestreiften Balken zwischen MK und TX ( $n = 8$ ,  $x \pm \text{SEM}$ , *d*  $p < 0.05$ ).

✓ Zusammenfassung: Talspiegel des CsA und der Metaboliten im Vollblut

- Die CsA Talspiegel im Vollblut der Ratten erniedrigten sich signifikant nach Allotransplantation im Laufe von 6 Wochen.
- Die Talspiegel des CsA und der CM der MK und OPK blieben konstant über die Dauer von 6 Wochen im Vollblut und unterschieden sich nicht voneinander.
- Innerhalb der TX Gruppen waren die CsA Talspiegel von TXEON zusätzlich noch niedriger als bei TXNEO und TXGEN.

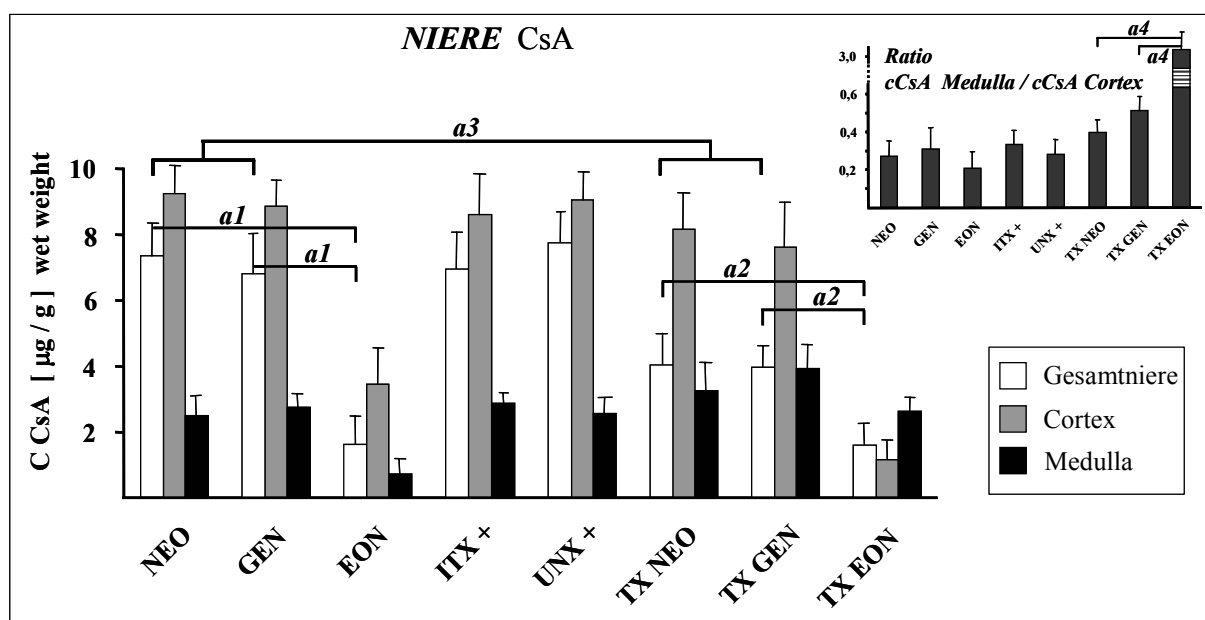
- Unter den CM im Vollblut zeigte nur AM4N signifikante Änderungen. Nach Allotransplantation waren die AM4N Spiegel deutlich höher als bei alleiniger Medikation, wobei jeweils EON, sowie TXEON sich durch zusätzliche Erhöhung der AM4N Werte von den anderen MK, sowie TX Gruppen abhob.
- Weder die unilaterale Nephrektomie (UNX+) noch die Isotransplantation (ITX+) jeweils mit Medikation veränderten weder die CsA noch die CM Spiegel verglichen mit den Medikationskontrolltieren.

### 6.2.1.2 Talspiegel des CsA und der CM im Nierengewebe

#### ► C<sub>0</sub> CsA Niere:

Die Analyse des CsA im Nierengewebe wurden auf 2 Arten durchgeführt: Zum einen wurde der Gehalt in der Gesamtniere bestimmt, zum anderen wurden die Konzentrationen in den makroskopisch unterscheidbaren Nierenzonen (Cortex, Medulla) gemessen.

Nach Allotransplantation fanden sich signifikant erniedrigte CsA Talspiegel in der Gesamtniere bezogen auf die MK Tiere bei TXNEO und TXGEN (*a3*), aber nicht bei den TXEON Tieren. Die CsA Gehalte der EON Ratten (*a1*), sowie der TXEON Ratten (*a2*) unterschieden sich signifikant innerhalb der MK bzw. TX Gruppe durch niedrigere Talspiegel, jedoch fand sich keine Differenz zwischen EON und TXEON selbst. Die Konzentrationsverhältnisse in der Niere, aber auch in anderen Organen lagen im Mittel um den Faktor 10 höher als die entsprechenden Werte im Vollblut.

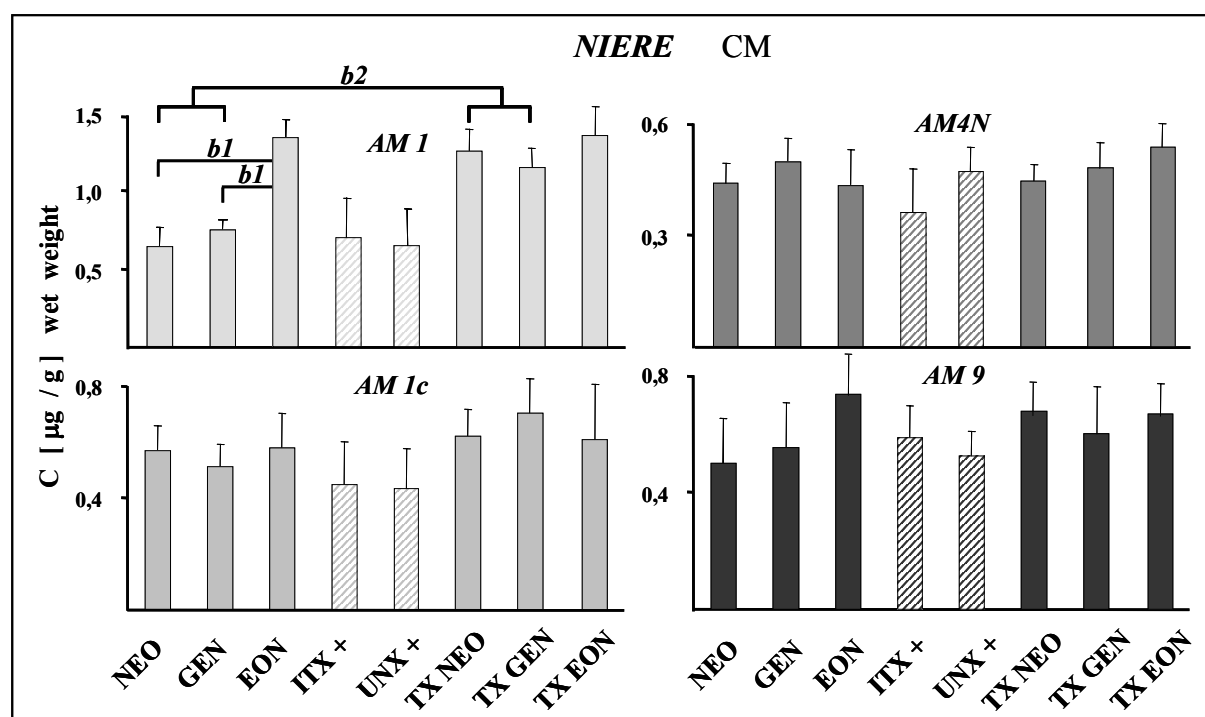


**Abb. 39** C<sub>0</sub> CsA der TX, MK und OPK in der Gesamtniere (weiße Balken) und aufgespalzt in die Nierenzonen Cortex (graue Balken) und Medulla (schwarze Balken). Oben rechts ist das Verhältnis der Konzentrationen in der Medulla zur Konzentration im Cortex dargestellt (n = 8, x ± SEM, *a* p < 0.05).

Betrachtet man die CsA Konzentrationen in den Nierenzonen, so zeigen sich im Cortex etwa 5-fach höhere Wert im Vergleich zum Nierenmark. Dies ist auch nicht überraschend, da der Nierencortex bis zu 10-mal stärker durchblutet ist als die Medulla. Bei den MK pendelt sich das Verhältnis cCsA Medulla / cCsA Cortex bei etwa 0,2 ein. Auch ITX und ITX+ liegen in diesem Bereich. Einen Anstieg dieses Faktors, jedoch nicht signifikant, sieht man nach Allotransplantation bei TXNEO und TXGEN. Eine signifikante Erhöhung findet sich bei TXEON (*a1*), was durch eine Zunahme des CsA Gehaltes in der Medulla bedingt ist und auf Folgen des Abstoßungsprozesses, z.B. Einblutungen, hindeutet (s. **6.2.8 Histopathologie der Niere** S.95).

► C<sub>0</sub> CM Niere:

Die Talspiegel der CM wurden nur im Gesamtnierengewebe ermittelt. Das CM Profil zeigte, anders als im Blut, nur signifikante Unterschiede der Konzentrationen des Metaboliten AM1. TXNEO und TXGEN wiesen deutlich erhöhte AM1 Werte im Vergleich zu NEO und GEN auf (*b2*). Die AM1 Konzentrationen zeigten keine Unterschiede zwischen TXEON und EON, sie waren aber in der MK Gruppe bei EON signifikant höher als bei NEO und GEN (*b1*). ITX+ bzw. UNX+ zeigten auch hier keine signifikanten Abweichungen von den MK, außer von EON (nicht dargestellt).

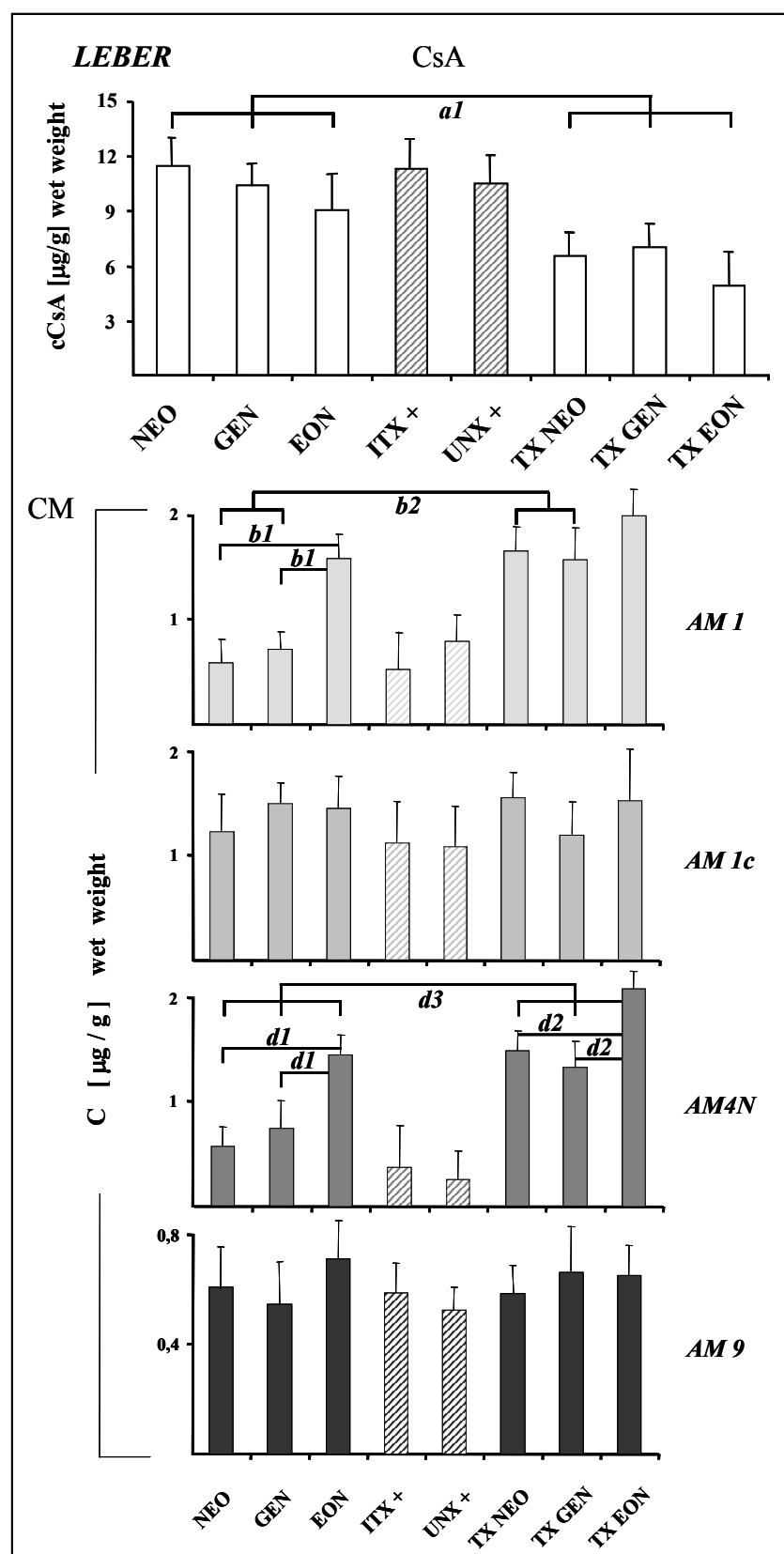


**Abb. 40** C<sub>0</sub> CM der TX, MK und OPK in der Gesamtniere. Die quergestreiften Balken der OPK (ITX+, UNX) trennen wieder die MK von den TX Gruppen (n = 8, x ± SEM, *b* p < 0.05).

✓ Zusammenfassung: Talspiegel des CsA und der Metaboliten in der Niere

- Die Talspiegel des CsA im Nierengewebe wiesen eine signifikante Verminderung nach Allotransplantation im Vergleich zur Medikation der Kontrolltiere auf.
- Innerhalb dieser beiden Gruppen zeigte jeweils EON, sowie TXEON eine zusätzliche Erniedrigung der CsA Werte im Vergleich zu den jeweiligen anderen Tieren in den Gruppen.
- Das Verhältnis der CsA Konzentrationen im Nierenmark zur Nierenrinde stieg aufgrund ansteigender Werte in der Medulla nach Allotransplantation an und erreichte ein Maximum bei TXEON.
- Die Talspiegel der CM in der Gesamtniere differierten nur bei AM1. Erhöhte Werte waren bei TXNEO und TXGEN im Vergleich zur entsprechenden MK feststellbar. Die AM1 Konzentrationen von EON waren signifikant erhöht gegenüber NEO und GEN, aber nicht im Vergleich mit TXEON.
- Die Isotransplantation (ITX+) bzw. Nephrektomie (UNX+) bewirkte keine Veränderungen verglichen mit den Medikationstieren, außer zu EON.

## 6.2.1.3 Talspiegel des CsA und der CM im Lebergewebe



**Abb. 41** C<sub>0</sub> CsA und CM der TX, MK und OPK in der Leber. Das große Diagramm zeigt die CsA Werte, darunter die Spiegel der 4 Metaboliten (n = 8, x ± SEM, **a, b, d** p < 0.05).

► C<sub>0</sub> CsA Leber

Die Unterschiede in der Leber waren weniger stark ausgeprägt als in der Niere aber dennoch signifikant zwischen MK- und TX- Gruppen (**a1**). Innerhalb dieser Gruppen konnten allerdings keine Unterschiede festgestellt werden. Weiterhin waren auch keine Unterschiede zwischen ITX, sowie ITX+ und den MK messbar (Die Unterschiede der OPK zu den TX Gruppen sind nicht eingezeichnet).

► C<sub>0</sub> CM Leber

Die Unterschiede in den AM1 Konzentrationen waren vergleichbar mit den Ergebnissen in den Nieren. Deutliche Erhöhungen waren bei den TXNEO und TXGEN Tieren im Vergleich zu NEO und GEN erkennbar (**b2**). Es wurden höhere Spiegel an AM1 bei der EON Gruppe im Vergleich zur restlichen MK (**b1**) beobachtet, die sich nach Allotransplantation (TXEON) nicht signifikant änderten. Die AM4N Spiegel lagen signifikant höher bei den TX Gruppen (**d3**) verglichen mit den MK Tieren. Innerhalb dieser

---

Gruppen waren wiederum die Werte der EON (*d1*) bzw. TXEON Tiere (*d2*) deutlich höher gegenüber den jeweiligen anderen Mitgliedern der Gruppen. Auch im Lebergewebe zeigten die OPK (ITX+ und UNX+) keine Auffälligkeiten und entsprachen den MK Ratten NEO und GEN.

✓ Zusammenfassung: Talspiegel des CsA und der Metaboliten in der Leber

- Im Lebergewebe fanden sich die höchsten Konzentrationen von CsA verglichen mit allen anderen untersuchten Organen.
- Wie auch in der Niere festgestellt, besitzen alle Ratten nach Allotransplantation in der Leber signifikant niedrigere CsA Konzentrationen als bei alleiniger Medikation. Jedoch waren keinerlei Unterschiede sowohl innerhalb der TX als auch der MK Gruppen feststellbar.
- Die Metabolitenkonzentrationen von AM1 und AM4N unterschieden sich signifikant in der Leber.
- AM1 war in den Gruppen TXNEO und TXGEN ggü. NEO bzw. GEN signifikant erhöht. Innerhalb der MK Gruppe war der Gehalt an AM1 der EON Tiere signifikant höher verglichen mit NEO und GEN. Keine Unterschiede fanden sich zwischen den AM1 Konzentrationen von EON und TXEON. Nach Allotransplantation wiesen alle Tiere gleiche AM1 Gehalte in der Leber auf.
- Ein vergleichbares Bild bietet sich auch bei Betrachtung des Metaboliten AM4N. Es gelten hier dieselben Unterschiede wie für AM1, jedoch mit der Ausnahme, dass zusätzlich die AM4N Werte der TXEON Gruppe so hoch lagen, dass sie sich einerseits signifikant von den Konzentrationen der EON Ratten, andererseits auch von TXNEO und TXGEN innerhalb der TX Gruppe unterschieden.
- Die OPK (ITX+, UNX+) zeigten auch in der Leber keine Unterschiede hinsichtlich CsA und CM Talspiegel zu den MK (außer zu EON) und wiesen dieselben Differenzen wie die MK zu den TX Gruppen auf.

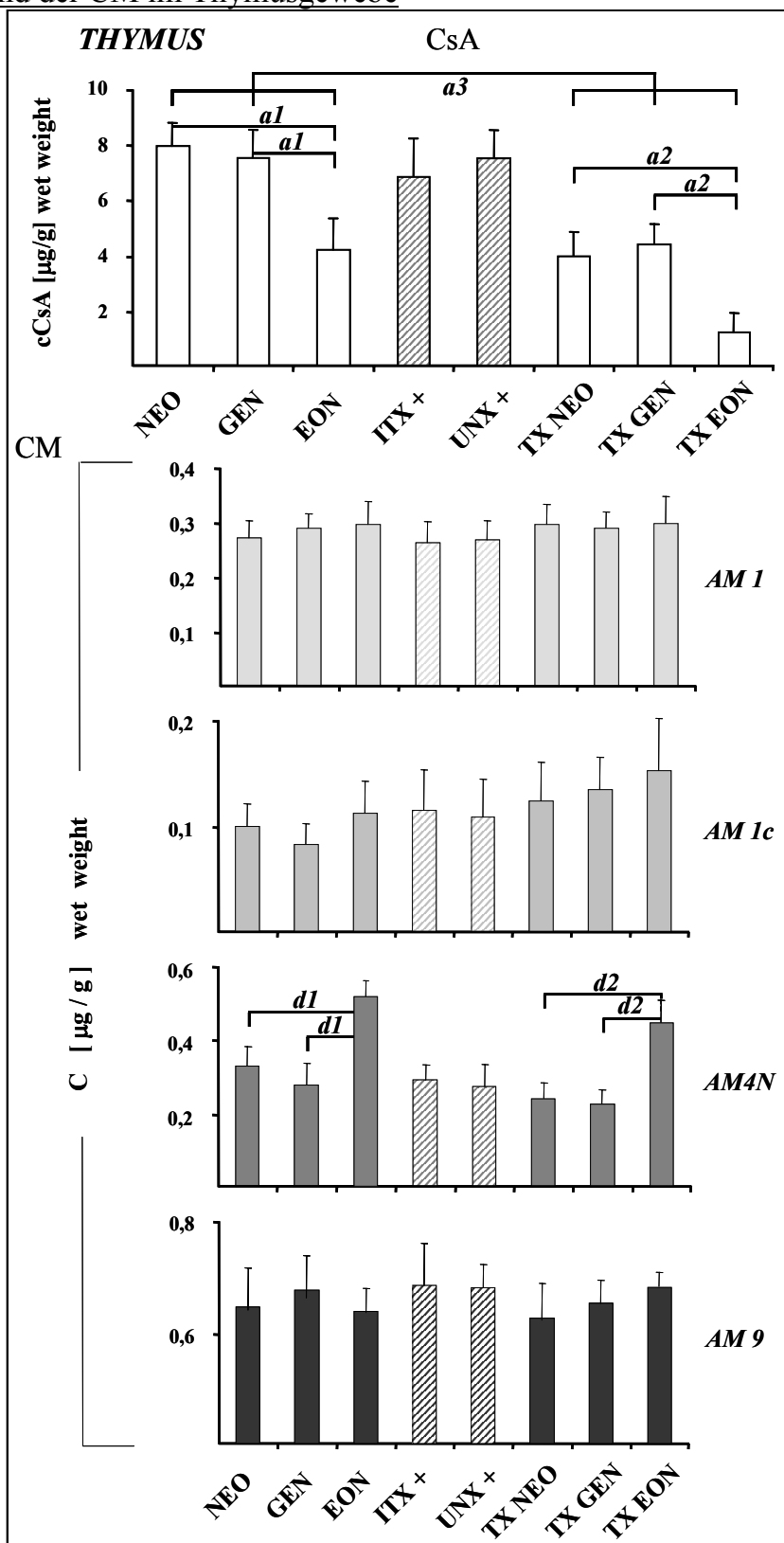
## 6.2.1.4 Talspiegel des CsA und der CM im Thymusgewebe

► C<sub>0</sub> CsA Thymus

Auch im Thymusgewebe wurden Analogien zu den bereits dargestellten Daten der Talspiegel des CsA beobachtet. Signifikante Erniedrigungen der CsA Konzentrationen waren zwischen den MK- und TX- Gruppen (*a3*), sowie innerhalb dieser Gruppen zu EON (*a1*) bzw. TXEON (*a2*) nachweisbar. Die CsA Talspiegel der OPK zeigen keine Differenzen zu NEO und GEN, aber zu EON und den TX Gruppen (nicht eingezeichnet).

► C<sub>0</sub> CM Thymus

Die einzigen Unterschiede im CM-Profil weisen die AM4N Werte auf. Es konnten hier jedoch keine Differenzen zwischen den MK und TX Gruppen festgestellt werden. Innerhalb der MK, sowie TX Gruppe waren die AM4N Talspiegel von EON (*d1*), sowie TXEON (*d2*) signifikant höher. Die OPK verhielten sich unauffällig bezüglich AM4N.



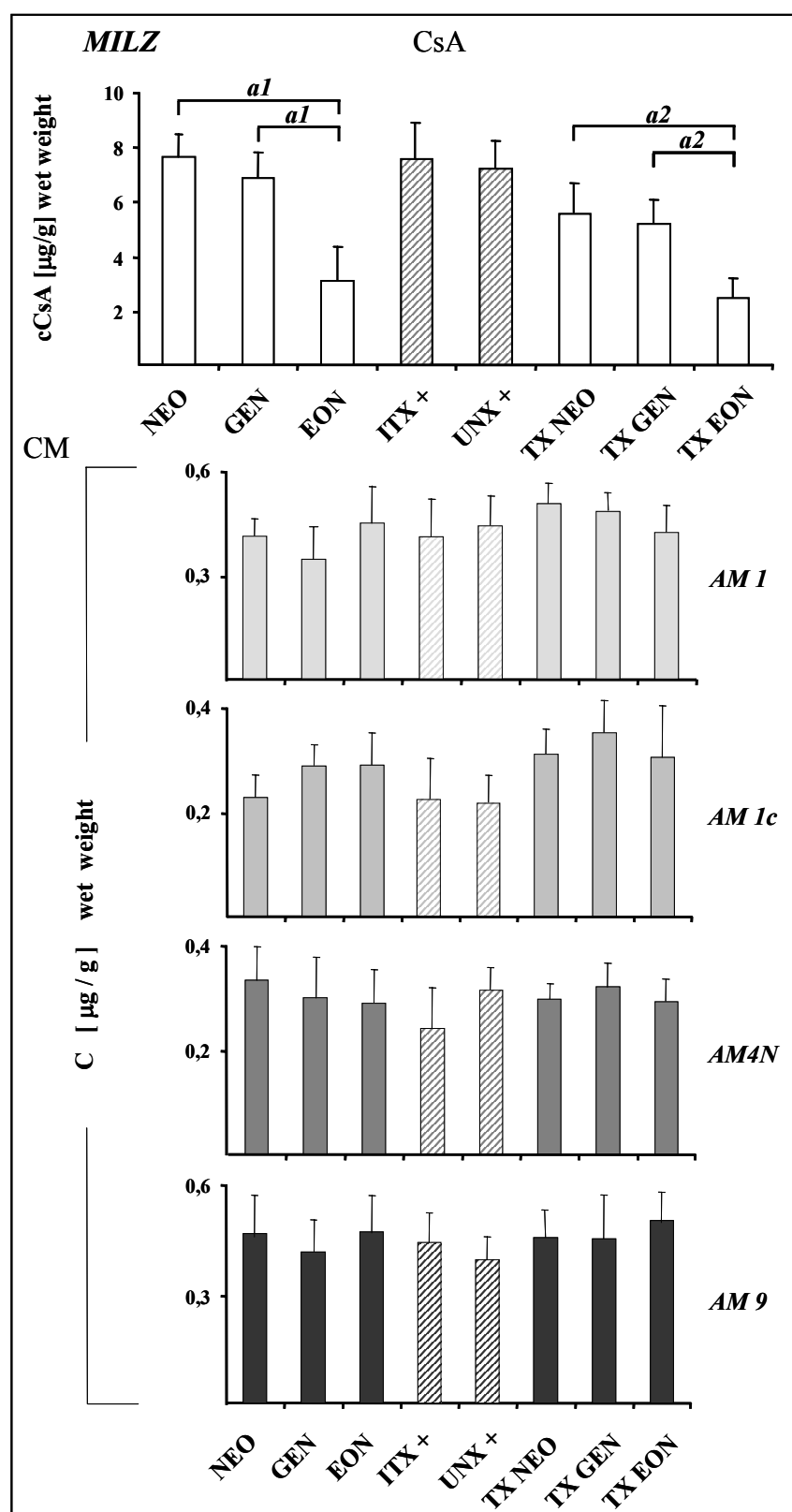
**Abb. 42** C<sub>0</sub> CsA und CM der TX, MK und OPK im Thymus. Das obere Diagramm zeigt die CsA Konzentrationen, darunter die Spiegel der 4 Metaboliten. Die quergestreiften Balken stellen jeweils die OPK dar (n = 8,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , *a, d*  $p < 0.05$ ).



✓ Zusammenfassung: Talspiegel des CsA und der Metaboliten im Thymus

- Nach Allotransplantation zeigten sich auch im Thymusgewebe niedrigere CsA Spiegel als bei Gabe von CsA in intakten Kontrolltieren, wobei sowohl die Ratten der EON Gruppe als auch der TXEON Gruppe die signifikant niedrigsten Konzentrationen in ihren Gruppen besaßen.
- Hinsichtlich der Metaboliten war nur AM4N auffällig im Thymusgewebe. Keine Unterschiede bestanden zwischen Kontrollmedikation und Allotransplantation.
- Signifikant höhere Werte von AM4N waren bei EON und TXEON verglichen mit den NEO und GEN bzw. TXNEO und TXGEN zu beobachten.
- Keine Unterschiede hingegen besaßen die OPK zu NEO und GEN, jedoch zeigten sie dieselben Unterschiede wie diese im Hinblick auf EON (nicht eingezeichnet).

## 6.2.1.5 Talspiegel des CsA und der CM im Milzgewebe



**Abb. 43** C<sub>0</sub> CsA, CM der TX, MK und OPK in der Milz. Das große Diagramm zeigt die CsA Werte, darunter die Spiegel der 4 Metaboliten. Die quergestreiften Balken zeigen jeweils die OPK (n = 8, x ± SEM, *a* p < 0.05).

► C<sub>0</sub> CsA

Im Milzgewebe konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den MK und den TX Gruppen nachgewiesen werden. Jedoch waren die CsA Werte für EON (*a1*) bzw. TXEON (*a2*) wieder signifikant niedriger in den jeweiligen Gruppen. Die OPK waren nicht verschieden von NEO und GEN bzw. TXNEO und TXGEN. (Unterschiede zu TX EON nicht eingezeichnet).

► C<sub>0</sub> CM Milz

In der Milz waren keine signifikanten Differenzen in den Profilen der Metaboliten zu erkennen.

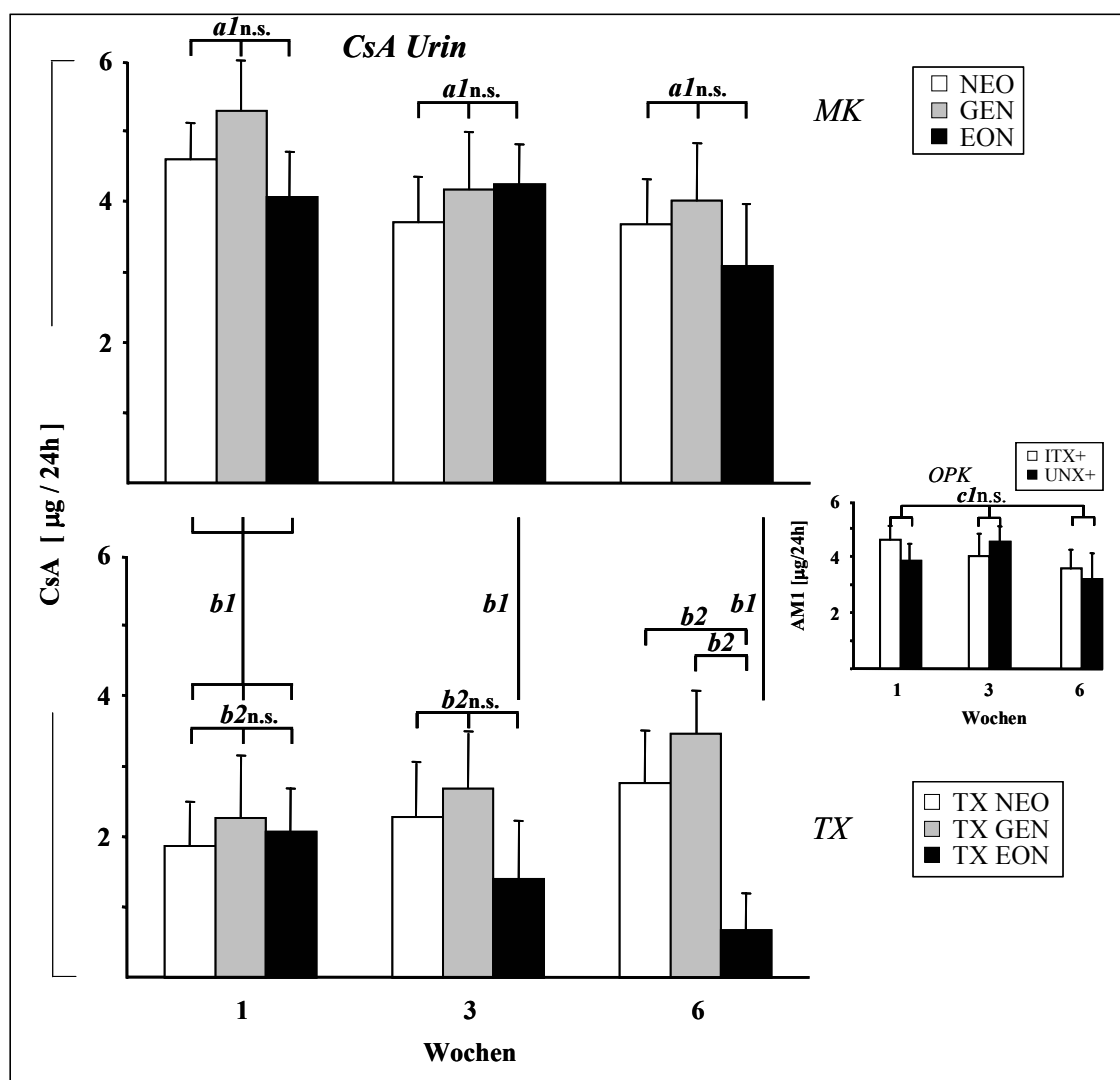
✓ Zusammenfassung: C<sub>0</sub> CsA, CM in der Milz

- Die TX veränderte die CsA Spiegel nicht, verglichen mit der MK Tieren
- EON bzw. TXEON besaßen in ihren Gruppen die niedrigsten CsA Werte.
- Es waren keine Unterschiede in den CM Konzentrationen messbar.

## 6.2.2 CsA und Metaboliten Ausscheidung in den 24h-Sammelurin

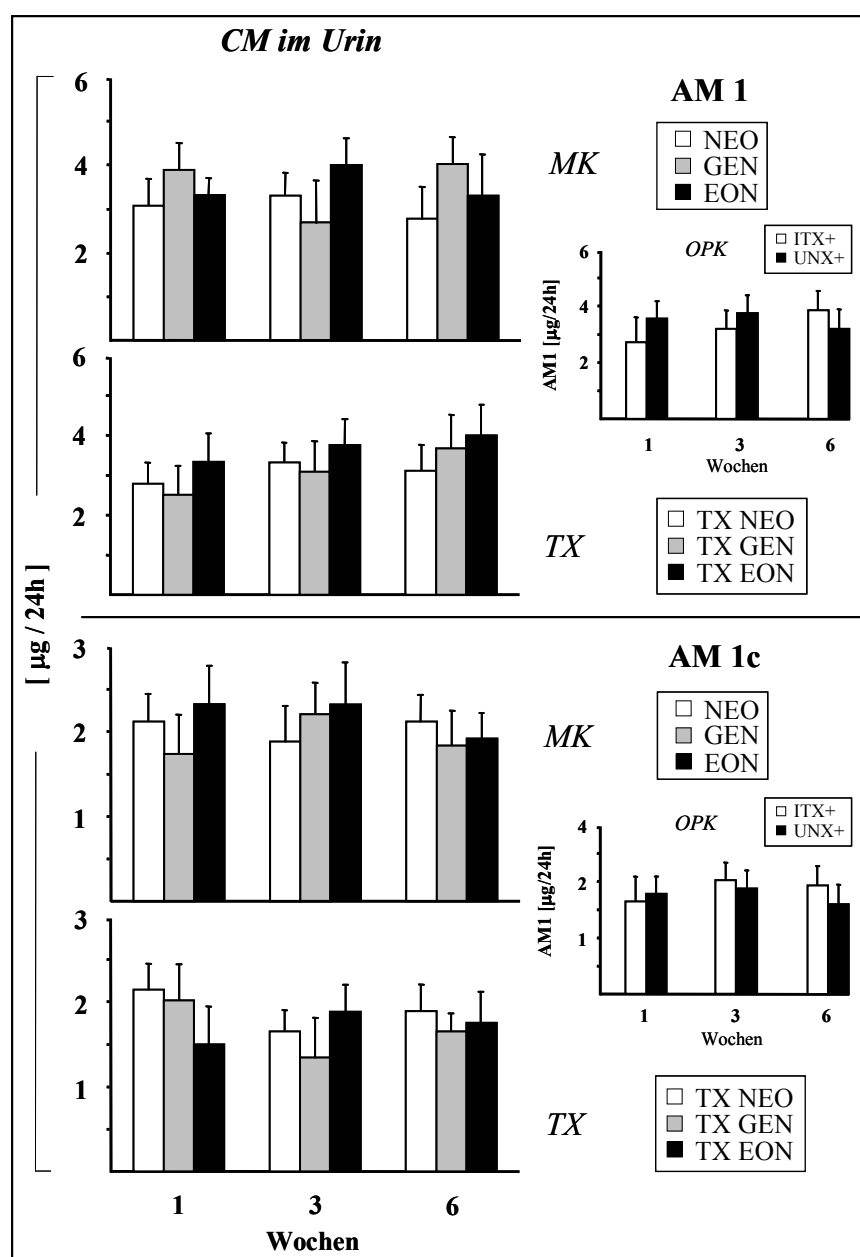
### ► CsA Ausscheidung in den 24h-Sammelurin

Die Bedeutung der Niere als Ausscheidungsorgan für CsA ist von untergeordneter Bedeutung, da im Durchschnitt nur etwa 6% der bioverfügbaren Arzneistoffmenge unverändert renal eliminiert werden. Jedoch bietet der Harn einen leichten Zugang zu möglichen bestimmbar Kennzeichen für die Bioverfügbarkeit des CsA oder Abstoßungsperioden. Hierzu eignet sich die Bestimmung des CsA und der CM Konzentrationen im 24h Sammelurin, da diese Substanzen im Urin kumulieren. Ein möglicher Zusammenhang zwischen CsA und CM Konzentrationen im Urin und der CsA Bioverfügbarkeit im Blut werden später diskutiert. Die absolute ausgeschiedene Stoffmenge in den Urin ist als  $[\mu\text{g}/24\text{h}]$  angegeben ( $\text{cCsA}$  bzw.  $\text{cCM}$   $[\mu\text{g}/\text{ml}] \times \text{Urinvolumen}$   $[\text{ml}/24\text{h}]$ ).



**Abb. 44** CsA Exkretion in den 24h-Sammelurin im Verlauf von 6 Wochen. Im oberen Diagramm sind die MK, darunter die TX Gruppen dargestellt. Das kleine Diagramm rechts zeigt die OPK ( $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , **a**, **b**, **c**  $p < 0.05$ ).

Die Ausscheidung des CsA in den Urin ist bei den MK und OPK Tieren über 6 Wochen unverändert (*a1n.s.*). Nach 1 Woche sind bei allen allotransplantierten Tieren (TX) signifikant niedrigere Werte im Urin als bei den MK nachzuweisen (*b1*), nach 3 und 6 Wochen nur noch bei EON ggü. TXEON (*b1*). Die TX Gruppen zeigen in den ersten 3 Wochen untereinander noch keine signifikanten Unterschiede (*b2n.s.*), jedoch nach 6 Wochen scheiden die TXEON Ratten wesentlich weniger CsA in den Urin aus als TXNEO und TXGEN (*b2*). Bei TXNEO und TXGEN war dagegen sogar ein Aufwärtstrend, bei TXEON ein Abwärtstrend während des Versuchsverlaufs erkennbar, der jedoch statistisch nicht signifikant war. Die OPK verhielten sich wie die MK und zeigten keine Unterschiede (*c1n.s.*) innerhalb ihrer Gruppe.

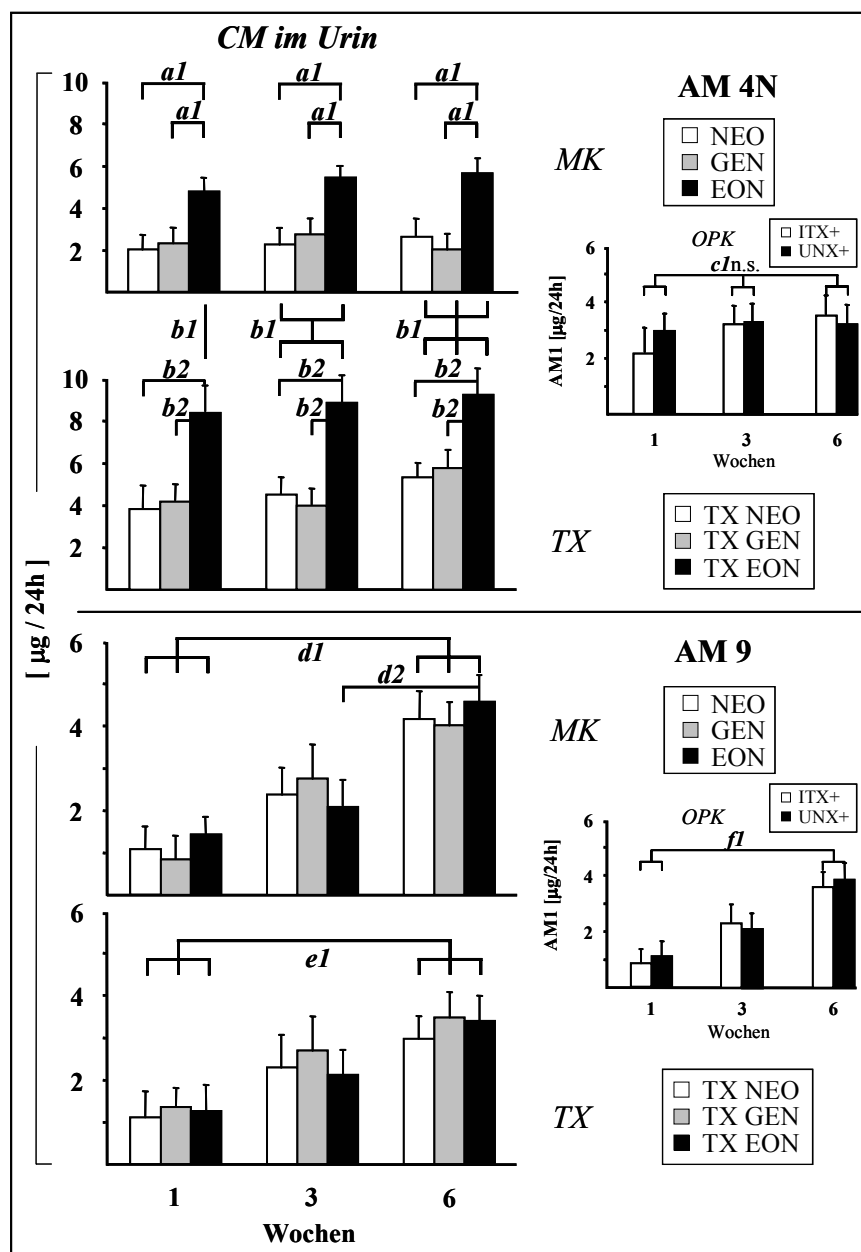


#### ► AM1 und 1c im 24h Urin

Es konnten keine signifikanten Unterschiede weder in den AM1 noch in den AM1c Ausscheidungen aller Gruppen im Urin nachgewiesen werden.

**Abb. 45** AM1 und 1c Ausscheidung in den 24h Sammelurin über 6 Wochen. Dargestellt sind in der oberen Hälfte die AM1, in der unteren Hälfte die AM1c Werte (n = 8, x ± SEM).

► AM4N im 24h Urin



Die MK unterschieden sich innerhalb der jeweiligen Zeitpunkte signifikant voneinander, da EON jeweils höhere Ausscheidungsraten an AM4N in den Urin aufwies als NEO und GEN (**a1**). Ein ähnliches Bild ergab sich nach TX. TXEON zeigte deutlich höhere Spiegel zu den jeweiligen Zeitpunkten als TXNEO und TXGEN (**b2**). Nach 1W überstiegen die AM1 Spiegel von TXEON die der EON Tiere, nach 3 W war dies auch bei TXNEO und nach 6 W bei allen TX Ratten der Fall (**b1**). Kein Effekt war innerhalb der OPK Gruppe erkennbar (**c1n.s.**). Zwischen den OPK und den TX Ratten bestand nur ein Unterschied zu TXEON (nicht eingezeichnet).

**Abb. 46** AM4N und AM9 Ausscheidungen in den 24h Urin. Dargestellt sind in der oberen Hälfte die AM4N, in der unteren Hälfte die AM1c Werte (n = 8, x ± SEM, *a, b, c, d, e, f* p < 0.05).

► AM9 im 24h Sammelurin

Im Versuchsverlauf über 6 Wochen konnte in allen Gruppen eine Zunahme der AM9 Spiegel im Urin beobachtet werden, wobei die Werte nach 6 W signifikant erhöht waren ggü. den Resultaten nach 1 W (*d1*, *e1*, *f1*). Ein zusätzlicher Unterschied fand sich bei EON in der MK Gruppe zwischen 3 und 6W (*d2*).

---

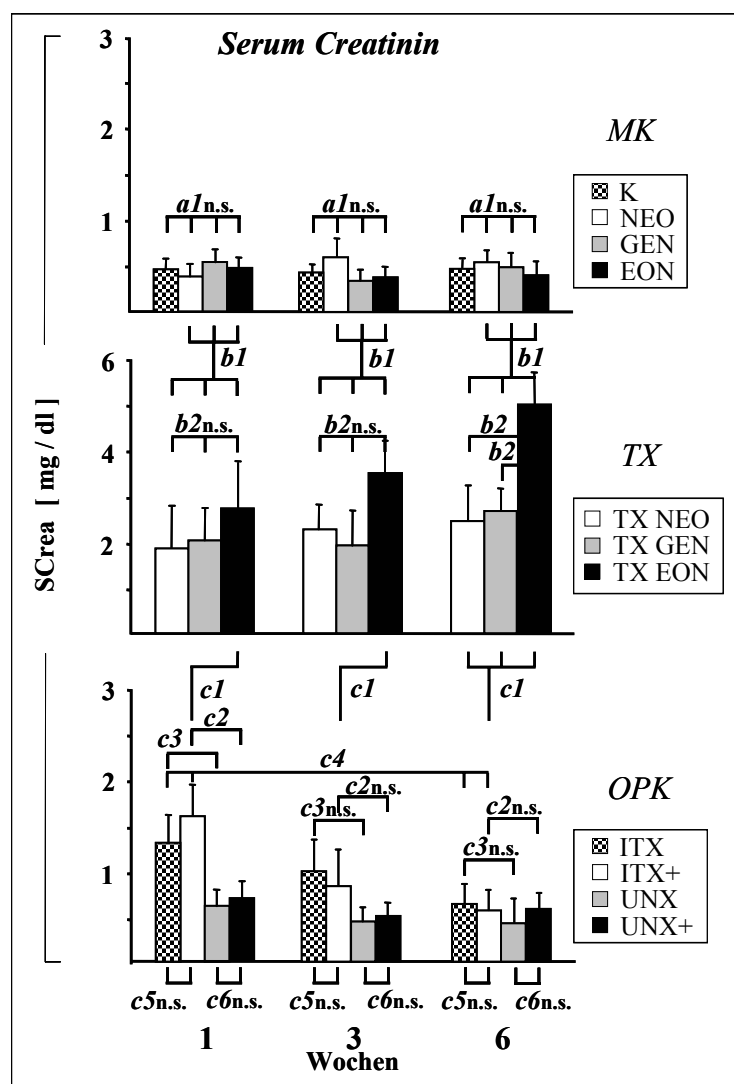
✓ Zusammenfassung: CsA und CM Ausscheidungen in den 24h Sammelurin

- Die alleinige Medikation über 6 Wochen (MK) beeinflusst die Ausscheidung des CsA in den Urin nicht. Auch innerhalb der Medikationsgruppe konnten keine Unterschiede festgestellt werden, obwohl bei den EON Tieren die CsA Konzentrationen im Blut und in den Organen signifikant niedriger lagen.
- Nach Allotransplantation waren die CsA Werte im Urin nach 1W bei allen TX Tieren niedriger als bei den MK, wobei nach 3W keine Unterschiede mehr zwischen TXNEO bzw. TXGEN zu NEO bzw. GEN nachweisbar waren. Anders bei TXEON, hier waren die CsA Werte nach 3 und 6W signifikant erniedrigt ggü. EON, so dass nach 6 W signifikante Unterschiede innerhalb der TX Gruppe vorhanden waren.
- Offensichtlich hatte sowohl die TX Operation (ITX+), als auch die unilaterale Nephrektomie (UNX+) keinen Einfluss auf die CsA Exkretion in den Urin. Somit ist die anfängliche Erniedrigung der CsA Ausscheidung in den Urin nach Allotransplantation auf andere Mechanismen, z.B. Immunreaktionen des Körpers auf das Transplantat zurückzuführen.
- Die CM AM1 und AM1c zeigten keine Unterschiede sowohl innerhalb der einzelnen Gruppen, als auch über den zeitlichen Verlauf des Versuches.
- Anders waren die Verhältnisse bei den CM AM4N und AM9. Bei den MK waren die AM4N Werte im Urin konstant über 6W, wobei EON zu jedem Zeitpunkt signifikant höhere AM4N Gehalte im Urin besaß.
- Nach Allotransplantation erhöhten sich die AM4N Ausscheidungen nach 1W zunächst nur bei TXEON verglichen mit EON. Nach 6 Wochen sezernierten alle TX Ratten mehr AM4N als die MK Tiere. Die oben bei den MK beschriebenen Unterschiede zu EON innerhalb der Gruppe bestanden auch nach Allotransplantation jeweils zu TXEON innerhalb der TX Gruppen. Wie auch die AM1 bzw. AM1c Werte betreffend, waren die AM4N Spiegel bei ITX+ und UNX+ nicht verändert und gleichwertig mit den Gehalten der MK.
- Eine deutliche Veränderung wiesen die AM9 Werte im 24h Urin auf. Schon bei den MK war bei allen Tieren ein signifikanter Anstieg nach 6W bezogen auf den 1W Wert zu verzeichnen. Die gleichen Verhältnisse waren nach Allotransplantation sowie bei den OPK nachzuweisen. Interessanterweise unterschieden sich die AM9 Ausscheidungen zwischen TX und MK Tieren nicht, somit muss von einem CsA verursachten Effekt ausgegangen werden.

### **6.2.3 Parameter der Nierenfunktion**

Zur Beurteilung der Nierenfunktion bzw. deren Beeinträchtigung wurden zum einen die Serum Creatinin (SCrea) Werte, zum anderen die 8-Isoprostan Ausscheidungen in den Urin herangezogen. Obwohl, bedingt durch den Creatinin blinden Bereich, ein Anstieg der harnpflichtigen Substanzen im Plasma erst ab einer Reduktion der glomerulären Filtrationsrate um ca. 50% nachzuweisen ist, konnte man bei den transplantierten Ratten z.T. hohe Anstiege in den SCrea Werten erkennen. Die wichtigste Vergleichsgruppe für die allotransplantierten Ratten (TX) hinsichtlich der Nierenparameter stellen die ITX+ Tiere dar, da diese die Auswirkungen der Transplantations-OP Technik, der unilateralen

Nephrektomie, sowie der Medikation in sich vereinen. Unterschiede zwischen den TX und den ITX+ Gruppen sind folglich allein auf die Reaktion des Körpers auf das Allotransplantat zurückzuführen und geben daher Aufschluss über die Effektivität der immunsuppressiven Therapie. Im Gegensatz zu den vorher dargestellten Ergebnissen, werden hier noch das unbehandelte Kontrollkollektiv (K), sowie die nicht medikamentös behandelten OPK (UNX und ITX) Ratten mitbesprochen.



**Abb. 47** Darstellung der Serum Creatininwerte der MK, TX und OPK Ratten über die Versuchsdauer von 6 Wochen ( $n = 8$ ,  $x \pm \text{SEM}$ , **a**, **b**, **c**  $p < 0.05$ ).

signifikant höher als bei ITX+ (**c1**). Die genauere Betrachtung der OP Kontrolltiere ist zur Beurteilung der Ursachen für eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion nach Allotransplantation von großer Bedeutung. Wirft man zunächst einen Blick auf die nephrektomierten Versuchstiere (UNX, UNX+), so findet man keine relevanten Unterschiede bezüglich des Einflusses der Medikation auf den SCrea Gehalt bei UNX+ (**c6n.s.**). Des Weiteren unterscheiden sich die SCrea Daten der UNX und UNX+ Gruppen nicht von dem unbehandelten Kontrollkollektiv (K) (nicht eingezeichnet). Anders verhält es sich bei isotransplantierten Tieren ITX und ITX+. Zu Beginn des Versuches nach 1W,

### 6.2.3.1 Serum Creatinin Werte

Die Creatinin Werte im Serum veränderten sich nicht innerhalb der MK Gruppe, auch nicht im Vergleich mit dem unbehandelten Kontrollkollektiv über 6W (**a1n.s.**). Im Kontrast dazu waren die SCrea Werte bei allen TX-Gruppen zu jedem Zeitpunkt signifikant erhöht verglichen mit den MK (**b1**). Die TX Gruppen zeigten erst nach 6W Unterschiede beim gegenseitigen Vergleich. Es waren bei TXEON signifikant höhere SCrea Spiegel als bei TXNEO bzw. TXGEN messbar (**b2**).

Wie oben bereits erwähnt stellen die ITX+ Tiere die beste Kontrollgruppe zu den allotransplantierten Ratten (TX) dar. Nach 1 und 3W erhöhte sich das SCrea nur bei den TXEON Tieren im Vergleich zu ITX+ (**c1**). Infolge des Ausheilens des operativen Eingriffes sanken die SCrea Werte bei ITX+ bzw. ITX am Ende der Versuchsdauer (**c4**), **jedoch** war das SCrea nach 6 Wochen bei allen TX Tieren

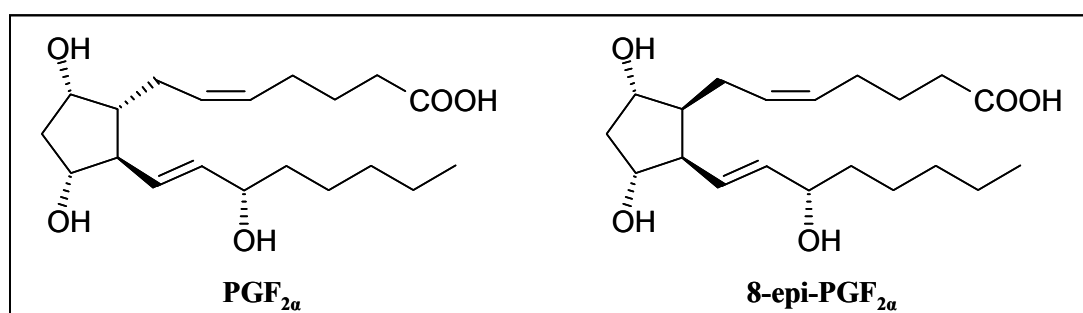
ist das SCrea bei ITX und ITX+ signifikant höher als bei K (nicht eingezeichnet), geht aber im Laufe der folgenden 5 W auf den Normwert zurück (**c4**). Auch hier finden sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Differenzen in den SCrea Konzentrationen zwischen ITX und ITX+ (**c5n.s.**).

Fokussiert man nun speziell die Unterschiede zwischen ITX und UNX bzw. ITX+ und UNX+, so bemerkt man nach 1W bei beiden Vergleichen signifikant höhere SCrea Spiegel bei ITX und ITX+ (**c2**, **c3**), die nach 3 und 6W nicht mehr vorhanden waren (**c2n.s.**, **c3n.s.**).

#### ✓ Zusammenfassung: Creatinin Werte im Serum

- Die ausschließliche Medikation (MK) mit CsA 10 mg/kg\*d führte in keinem Fall zu einer Erhöhung der SCrea Spiegel im Vergleich zu einem unbehandelten Kollektiv. Dagegen zeigten alle allotransplantierten Ratten (TX) eine signifikante Erhöhung des SCrea. Nach 6 W übertrafen die TXEON Ratten innerhalb der TX Gruppe die SCrea Spiegel von TXNEO und TXGEN.
- Das SCrea der ITX+ Tiere, welche die Auswirkungen der Operation, Nephrektomie und Medikation zeigten, wurde nach 1 bzw. 3 von TXEON, nach 6 Wochen von allen TX Gruppen übertroffen. Dieser Vergleich gibt Aufschluss über die Effektivität der immunsuppressiven Therapie auf die Nierenleistung nach Allotransplantation.
- Sowohl die Nephrektomie (UNX), als auch die Kombination aus Nephrektomie und Medikation (UNX+) erhöhen die SCrea Konzentration nicht.
- Die Isotransplantation und Nephrektomie (ITX), sowie die zusätzliche Kombination mit CsA (ITX+) führt zu einem gleichen Ausmaß an Erhöhung des SCrea, die nach 6 Wochen im Sinne einer restitutio ad integrum wieder auf den Ausgangswert zurückging.
- Beim Vergleich der ITX Tiere mit den UNX kommt man zu dem Schluss, dass der SCrea Anstieg nach 1W allein durch die OP bedingt ist und in der Folge wieder auf ein normales Niveau absinkt. Die zusätzliche Medikation (ITX+, UNX+) führte zum gleichen Ausmaß an Erhöhung des SCrea. Folglich hat die Medikation auf diese initiale Erhöhung in den SCrea Werten keinen Einfluss, was auch durch die konstanten SCrea Werte der Medikationsgruppen über die ganzen 6 Wochen bestätigt wurde.

#### 6.2.3.2 8-Isoprostan Gehalt im 24h Urin



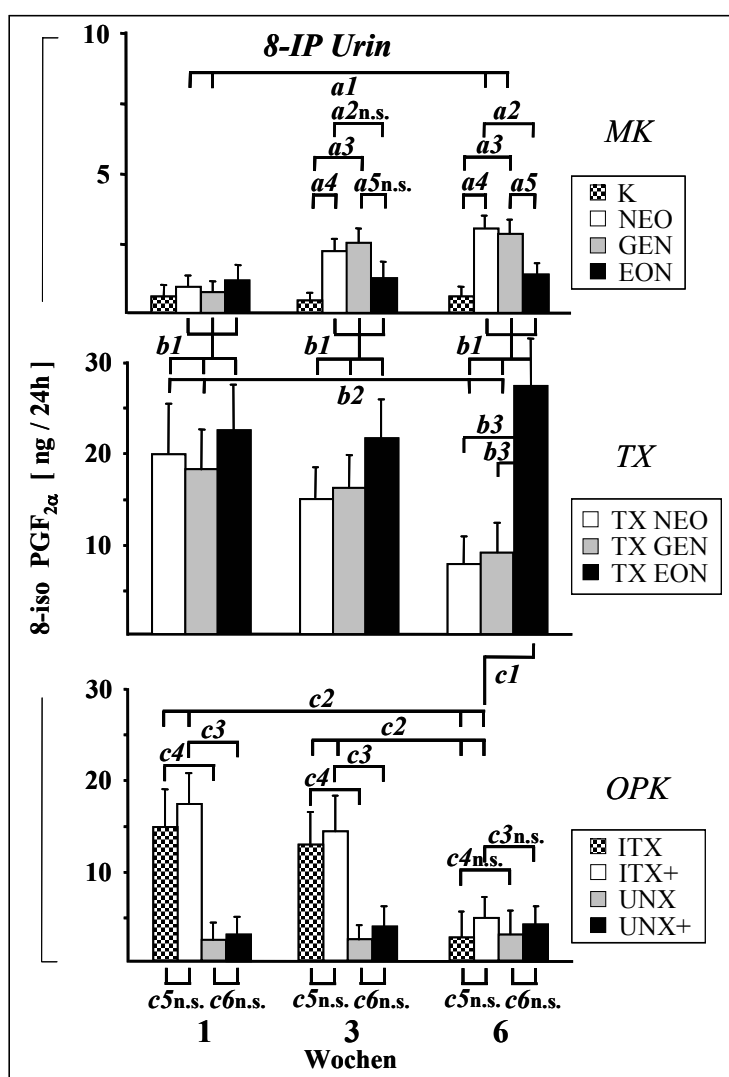
**Abb.48** Strukturformeln des PGF<sub>2α</sub> und des 8-epi-PGF<sub>2α</sub> (8-Isoprostan)



Die Annahme, die Genese dieser Prostaglandin (PG) Derivate verlaufe via Cyclooxygenase-1 (COX-1) (Klein *et al.*, 1997) hat sich als falsch herausgestellt und es besteht nun Einigkeit darüber, dass die Isoprostane (IP) die Folgen von Lipidperoxidation durch freie Sauerstoffradikale (Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999; Janssen 2000) darstellen. Die Isoprostane gelten als Marker für oxidativen Stress im Gewebe, da sie direkt aus Arachidonsäure und Sauerstoff- bzw. Hydroxyl- oder Hydroperoxyd-Radikalen gebildet werden. Es werden Forschungen betrieben, die Bestimmung der IP bei vielen Krankheitsbildern (z.B. Arteriosklerose, M. Alzheimer, Diabetes mellitus, Asthma bronchiale) (Patrono *et al.*, 1997) in der klinischen Labordiagnostik zu etablieren. Die deutlichsten pharmakologischen Effekte zeigt 8-epi-PGF<sub>2α</sub> (8-IP) z.B. durch arterielle Vasokonstriktion in der Niere, der Retina und der Lunge sowie im Gehirn und im Dünndarm. Weitere vasokonstriktorische Effekte sind auf die Aorta, Carotiden und die koronaren Gefäße nachweisbar (Janssen, 2000).

Nach 3 und 6 W lagen die täglichen die 8-IP Ausscheidungen in den Urin bei den MK NEO und GEN signifikant über den Werten der Kontrolltiere (K) (*a3*, *a4*) und waren am Ende der Versuchsreihe erhöht gegenüber ihren Anfangswerten (*a1*). EON zeigte nach 1 bzw. 3W keine signifikanten Abweichungen sowohl von K und als auch von NEO bzw. GEN (*a2n.s.*, *a5n.s.*) und besaß dadurch deutlich geringere 8-IP Werte als NEO und GEN am Ende der Versuchsdauer (*a2*, *a5*). In der TX Gruppe fielen die initial hohen Stoffmengen an 8-IP im Urin von TXNEO und TXGEN erst gegen Ende der Versuchsdauer signifikant ab (*b2*), was bei TXEON nicht erkennbar war, so dass sich TXEON nach 6W signifikant von TXNEO und TXGEN unterschied (*b3*). Zu allen Zeitpunkten jedoch schieden alle TX Gruppen deutlich mehr 8-IP aus als die MK Tiere (*b1*).

Wie bereits bei den Ergebnissen der SCrea Analysen erwähnt wurde, stellt die Gruppe der ITX+ Ratten die beste Vergleichsmöglichkeit für die Effektivität der CsA Therapie dar. Im gesamten Zeitverlauf war



**Abb. 49** Darstellung der 8-IP Ausscheidungen in den 24h Urin der MK, TX und OPK Ratten über die Versuchsdauer von 6 Wochen (n = 8, x ± SEM, *a*, *b*, *c* p < 0.05).

---

bei der TXEON Gruppe, bezogen auf ITX+, nach 6W eine signifikant höhere 8-IP Exkretion nachweisbar (*c1*). Die Nephrektomie mit Medikation (UNX+) und ohne (UNX) hatte zu keinem Zeitpunkt Einfluss auf die 8-IP Ausscheidung in den Urin sowohl hinsichtlich der beiden Gruppen zueinander (*c6n.s.*) noch bezüglich den MK (nicht eingezeichnet). Deutliche Unterschiede waren bei den isotransplantierten Tieren (ITX und ITX+) auffindbar. Zwar unterschieden sie sich nicht voneinander (*c5n.s.*), jedoch waren ihre 8-IP Werte nach 1 und 3W signifikant höher als die der MK Tiere (nicht eingezeichnet). Das Ausmaß der Reduzierung der initial erhöhten 8-IP Exkretion bei TXNEO und TXGEN über 6W (*b2*) war fast identisch bei den ITX bzw. ITX+ Tieren (*c2*). Am Ende der Versuchsdauer differierten die anfänglich unterschiedlichen OPK Gruppen (*c3*, *c4*) nicht mehr untereinander (*c3n.s.*, *c4n.s.*), auch nicht gegenüber den MK Tieren. Aufgrund der relativ starken Streuung der Daten der TX Tiere unterschied sich ITX+ am Ende auch nicht von TXNEO und TXGEN.

✓ Zusammenfassung: 8-IP Ausscheidung in den Urin über 24h

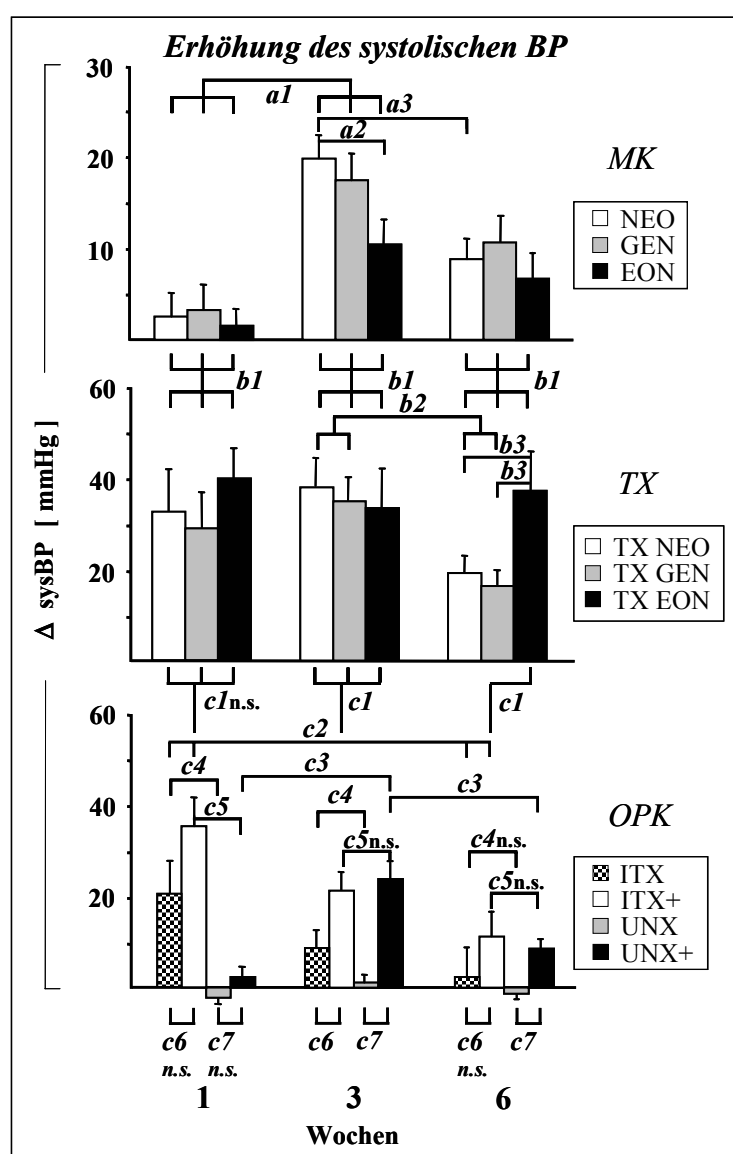
- Bei ausschließlicher Medikation (MK) erhöhte sich die Ausscheidungsrate für 8-IP bei NEO und GEN ab 3 Wochen verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren. Bei EON war dies nicht der Fall, so dass diese Tiere am Ende niedrigere 8-IP Werte als NEO und GEN aufwiesen.
- Nach Allotransplantation (TX) zeigen alle Ratten über 6W hinweg um bis zu 10-fach höhere 8-IP Ausscheidungsraten als die MK Tiere. Die Werte von TXNEO und TXGEN fallen jedoch bis zum Ende des Versuches deutlich ab, so dass nach 6W ein signifikanter Unterschied zu TXEON besteht.
- Sowohl die unilaterale Nephrektomie (UNX), als auch deren Kombination mit CsA (UNX+) beeinflussen die 8-IP Exkretion nicht mehr als die ausschließliche Medikation (MK).
- Das CsA hat keinen Einfluss auf die 8-IP Werte im Urin nach Isotransplantation mit Nephrektomie (ITX und ITX+). Jedoch sind die Werte dieser OPK signifikant erhöht ggü. den MK Gruppen bzw. ggü. UNX, UNX+ nach 1 bzw. 3 W. Nach 6 W finden sich innerhalb der OPK keine Unterschiede mehr im Bezug auf die 8-IP Exkretion.
- Der Abfall der initial erhöhten 8-IP Ausscheidung in den Urin bei ITX und ITX+ gleicht dem der TXNEO bzw. TXGEN Gruppen sehr stark, so dass sich hierbei auch keine signifikanten Unterschiede ergeben. Folglich ist dieser Effekt allein auf die Operation bzw. das Ischämieintervall zurückzuführen.
- Die große Differenz von TXEON zu ITX+ bzw. den anderen allotransplantierten Tieren am Ende der Versuchsreihe deutet auf Abstoßungsprozesse hin, da sowohl die OP bzw. die Medikation, als auch die Kombination aus beiden keine derartige Erhöhung in der 8-IP Ausscheidung bewirken.

#### 6.2.4 Veränderung des systolischen Blutdrucks (sysBP)

Das Symptom der Hypertonie ist eine häufige Komplikation bei der Therapie mit CaN Inhibitoren nach Organtransplantation. Die hierbei zugrunde liegenden Mechanismen sind sehr komplex und nur z.T. bekannt (s. 1.7.4). Nach Nierentransplantation spielt

sicherlich auch die Nierenfunktion eine große Rolle, da die Niere eine Schlüsselrolle in der physiologischen Blutdruckregulation einnimmt. Die folgenden Angaben zur Blutdruckänderung sind bezogen auf das unbehandelte Kontrollkollektiv (K).

Es konnte bei allen MK Tieren erst nach 3 Wochen ein deutlicher Anstieg des sysBP registriert werden (*a1*), wobei sich zu diesem Zeitpunkt EON zusätzlich durch einen niedrigeren Blutdruck signifikant von NEO und GEN unterschied (*a2*). Nach 6W fiel der sysBP bei allen MK Ratten etwas ab, wobei sich nur bei NEO Signifikanzen abzeichneten (*a3*). Der sysBP nach 6 wöchiger Medikation (MK) war jedoch bei allen Gruppen immer noch signifikant höher als zu Beginn der Versuchsreihe. Nach TX zeigten sich deutlich erhöhte sysBP Werte im Vergleich zu den MK Tieren bereits nach einer Woche (*b1*). Innerhalb der TX Gruppen fiel der Blutdruck nach 6 Wochen bei TXNEO und TXGEN signifikant ab (*b2*). Der konstant gebliebene BP der TXEON Tiere führte am Ende zu deutlichen Unterschieden in dieser Gruppe (*b3*).



**Abb. 50** Änderung des systolischen Blutdrucks bei den MK-, TX- und OPK-Ratten ( $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , *a, b, c*  $p < 0.05$ ).

Ein geeigneter Ansatz zur Klärung der generellen Ursachen der Blutdruckveränderungen ist auch hier die Betrachtung der OP-Kontrolltiere. Der Vergleich der sysBP Daten der allotransplantierten Tiere mit den isotransplantierten (mit CsA, ITX+) zeigt nach 1 Woche keine Unterschiede (*c1n.s.*). Erst nach 3W ist der Blutdruck bei allen TX Ratten signifikant höher als bei ITX+ (*c1*), nach 6W besteht dieser Unterschied nur noch bei TXEON (*c1*).

Die initiale Erhöhung des Blutdrucks war bei ITX+ stärker ausgeprägt als bei den isotransplantierten Tieren ohne Medikation (ITX), jedoch war diese Differenz nach 1W nicht signifikant (*c6n.s.*), nach 3W dagegen schon (*c6*). Im zeitlichen Verlauf über 6W ist eine vergleichbare Reduzierung des Blutdrucks bei diesen beiden Gruppen erkennbar (*c2*), so dass am Ende des Versuches keine Unterschiede bestanden (*c6n.s.*). Die Nephrektomie führte nur in Kombination mit

---

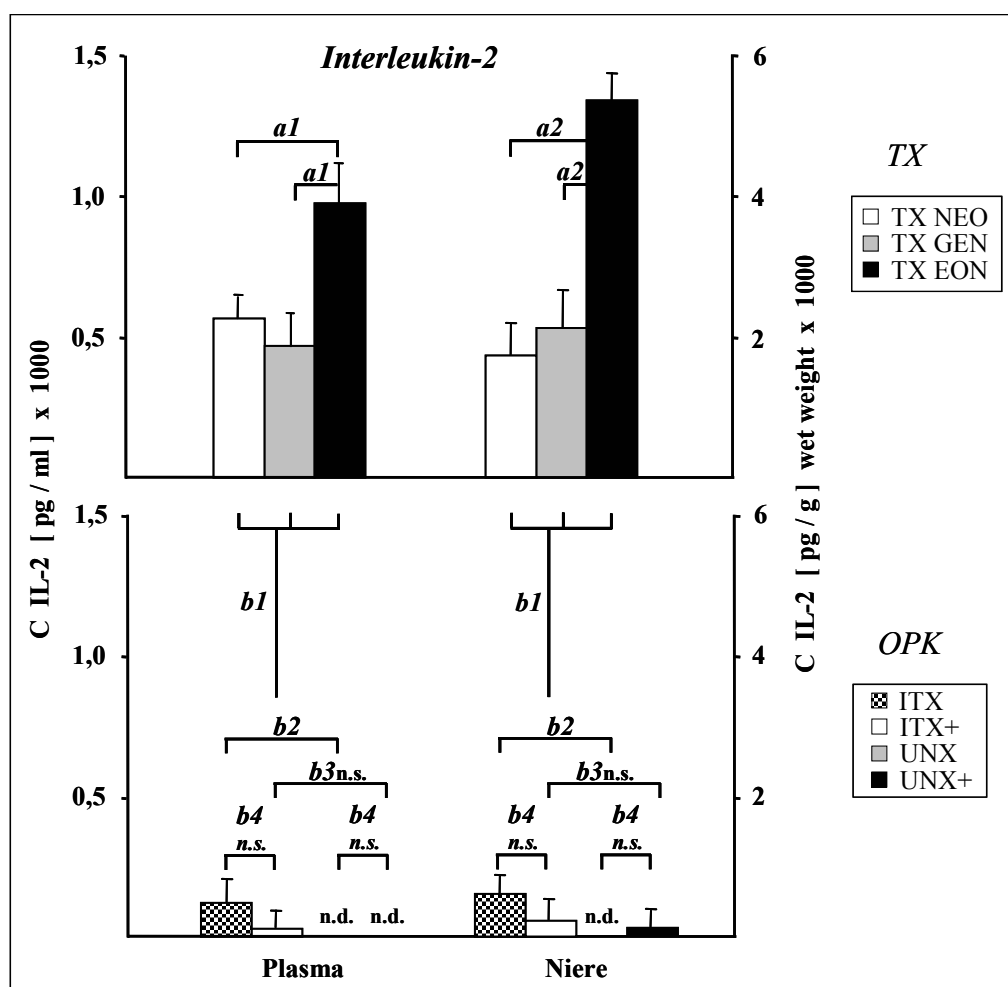
CsA zu einem Anstieg des sysBP nach 3 W im Vergleich UNX zu UNX+(c7, c3) und ging nach 6W ebenso wie bei den MK Tieren zwar signifikant zurück (c3) war aber im Vergleich zu den UNX Ratten immer noch erhöht (c7). Beim Vergleich ITX zu UNX (c4) bzw. ITX+ zu UNX+ (c5) wird deutlich, dass der Einfluss der OP den anfänglichen Blutdruckanstieg verursacht und nicht die unilaterale Nephrektomie (c4), worauf das CsA keinen Einfluss hat (c5 bzw. c6n.s., c7n.s.). Die Blutdrucksituation nach 3W (c5n.s.) scheint vornehmlich durch CsA hervorgerufen zu werden, da der Einfluss der OP zu diesem Zeitpunkt beinahe abgeklungen ist (c6) und die Nephrektomie den sysBP auch nicht beeinflusst. Nach 6W findet sich die gleiche Situation mit reduzierten BP Werten, vergleichbar mit der Situation bei den MK Tieren, was wieder auf das Medikament zurückzuführen ist, da die Beeinträchtigungen durch die OP nach 6 Wochen vollständig verschwunden sind und somit keine Unterschiede mehr zwischen ITX und UNX (c4n.s.) bzw. ITX+ und ITX (c5n.s.) bestehen.

✓ Zusammenfassung: Änderung des sysBP

- Das CsA verursacht bei der verwendeten Dosierung von 10 mg/kg\*d (MK) einen signifikanten Blutdruckanstieg erst nach 3 wöchiger Applikation. Dieser Effekt war bei EON weniger stark ausgeprägt als bei NEO bzw. GEN. Nach 6 Wochen ist ein leichtes Abfallen der systolischen Blutdruckwerte bemerkbar.
- Nach Allotransplantation besaßen alle Ratten signifikant erhöhte Blutdruckwerte im Vergleich zu den MK über die komplette Zeitdauer. Unterschiede innerhalb der Gruppen waren im Gegensatz zu den MK erst nach 6 Wochen erkennbar. Anders als bei reiner Medikation besaß TXEON einen deutlich höheren sysBP als TXNEO und TXGEN.
- Wie zuvor beschrieben, stellt die ITX+ Gruppe die beste Vergleichsmöglichkeit für die allotransplantierten Tiere dar. Die Isotransplantation mit CsA (ITX+) führt zu demselben anfänglichen Blutdruckanstieg wie er auch nach Allotransplantation erkennbar ist. Die Medikation, sowie die unilaterale Nephrektomie mit und ohne CsA haben hierauf keinen Einfluss (s. ITX, UNX, UNX+). Somit liegt die Ursache für diesen initialen Anstieg z.B. an der Güte der Gefäßanastomosen, denn die Konsequenz einer Mangelperfusion der Niere aufgrund einer Stenose wäre eine Blutdrucksteigerung. Dieser Effekt reduziert sich durch Ausheilen der Folgen des Eingriffs nach 3 und 6 Wochen beinahe vollständig.
- Eine Steigerung des Blutdrucks nach 3 Wochen ist allein durch das Medikament bedingt, denn es zeigen sich keine synergistischen oder additive Effekte bezüglich der Steigerung des systolischen Blutdrucks einerseits durch die Folgen der OP, andererseits durch die Calcineurin Blockade durch CsA.
- Nach 6 Wochen sind die Blutdruckdaten von ITX+ und UNX+ auf demselben Niveau wie die Medikationskontrollen, die Blutdrücke der nicht mit CsA behandelten OP Kontrolltiere ITX und UNX liegen im Bereich des unbehandelten Kontrollkollektivs (K). Folglich sind die erhöhten sysBP Werte der TXEON Tiere gegenüber den TXNEO, TXGEN und ITX+ Gruppen nach 6 Wochen weder durch die OP, noch durch das CsA oder synergistische bzw. additive Effekte bedingt.

### 6.2.5 Interleukin-2 (IL-2) Konzentrationen im Plasma und Nierengewebe

Die Hemmung der Synthese des Cytokins IL-2 ist das Ziel der CsA Therapie. Es gibt bisher keine schlüssigen Daten zu Gewebespiegeln des IL-2 nach TX weder bei der Ratte, noch beim Menschen. IL-2 ist praktisch nicht nachweisbar in den MK und nur in sehr niedrigen Konzentrationen in den OPK detektierbar. Die TX dagegen weisen im Plasma und Nierengewebe trotz immunsuppressiver Medikation signifikant höhere Spiegel auf (**b1**).



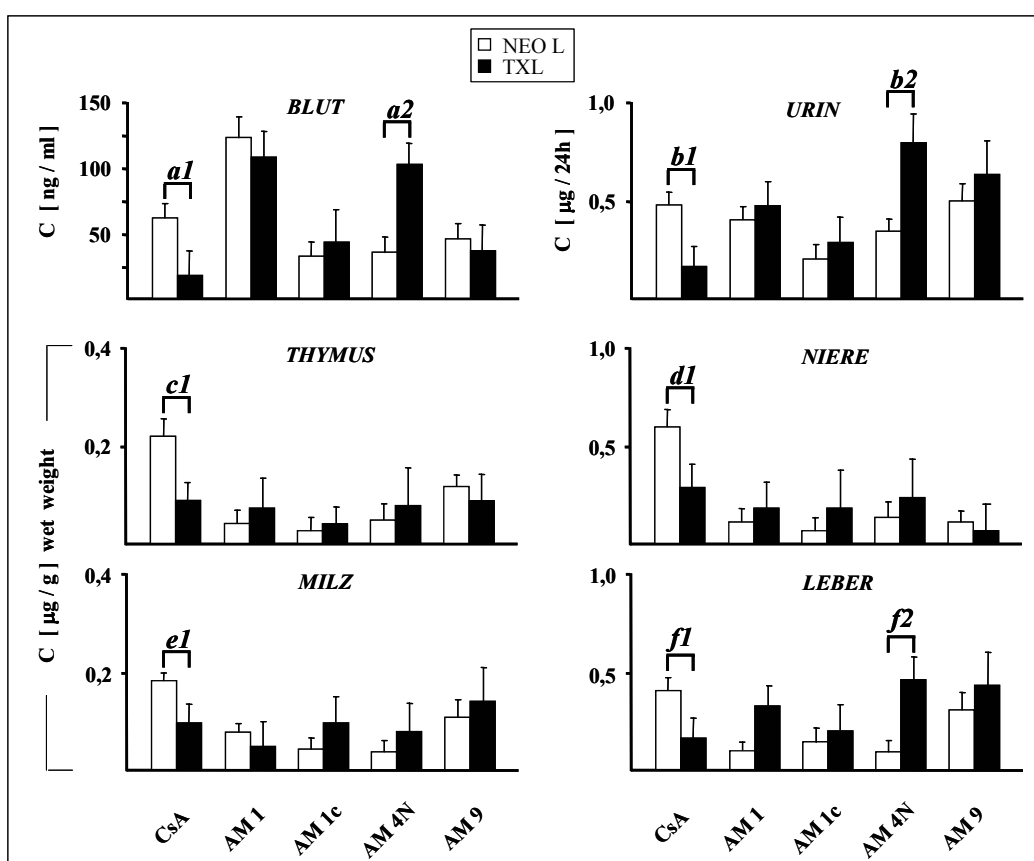
**Abb. 51** IL-2 Spiegel im Plasma und Nierengewebe der TX und OPK Tiere (n = 8, x ± SEM, **a**, **b**, **c** p < 0.05)

Die Tiere der TXEON Gruppe hatten sowohl im Plasma als auch im Nierengewebe deutlich höhere IL-2 Konzentrationen als die Ratten der TXNEO bzw. TXGEN Gruppen. Dieses Ergebnis ist gut mit den niedrigeren Blut- bzw. Gewebespiegeln des CsA bei Anwendung von CsA Eonlabs® in Einklang zu bringen. Bei der Betrachtung der OPK wird deutlich, dass die OP (ITX) an sich einen sehr geringen Einfluss auf die IL-2 Konzentrationen hat (**b2**), wobei sogar die zusätzliche Medikation (ITX+) diesen geringen Einfluss nicht signifikant verringern kann (**b4n.s.**). Der Vergleich ITX+ zu UNX+ zeigt auch keinen signifikanten Unterschied (**b3n.s.**).

## 6.2.6 Ergebnisse einer unterdosierten Kontrollgruppe zur Erzielung einer manifesten Abstoßungsreaktion

### ► C<sub>0</sub> CsA und CM im Vollblut und Gewebe

Parallel zu den bereits beschriebenen TX Versuchen wurden manifeste Abstoßungsreaktionen an einem kleinem Kollektiv (n=5) unterdosierter allotransplantierten Versuchstiere studiert (s. *Methoden*) und zusätzlich mit einem entsprechenden Kontrollkollektiv für die Medikation (Neoral 1mg/kg\*d) verglichen. Die Versuchsreihe wurde spätestens nach 1 Woche aus ethischen Gründen abgebrochen.

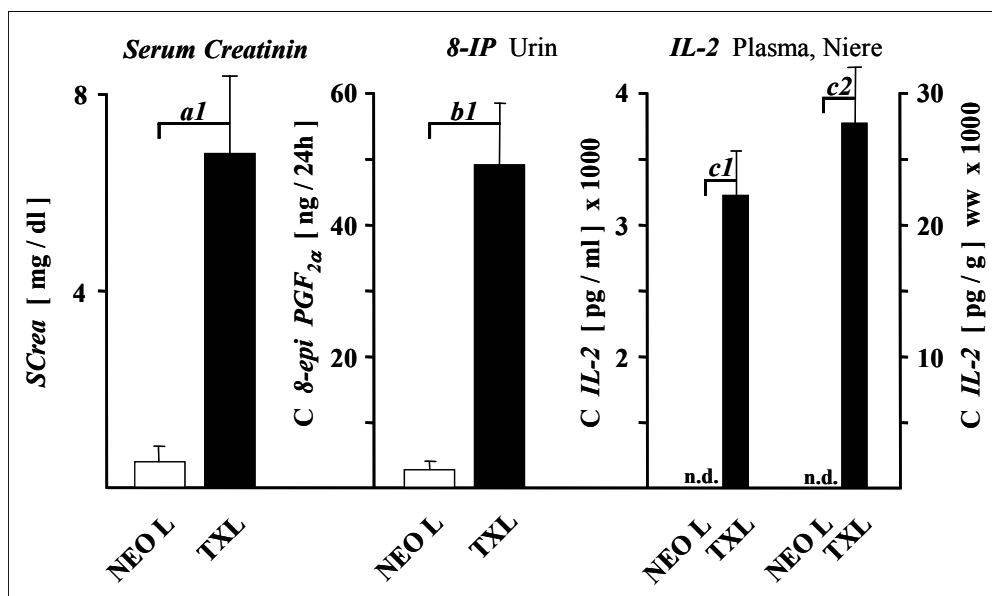


**Abb. 52** Übersicht der CsA und CM Talspiegel der unterdosierten allotransplantierten Vergleichsgruppe, sowie einem Kontrollkollektiv mit reiner Medikation (Neoral 1mg/kg\*d) (n = 5, x ± SEM, **a, b, c, d, e, f** p < 0.05).

Die CsA und CM Werte zeigten im Wesentlichen vergleichbare Veränderungen wie bereits bei der 10 mg/kg Dosierung dargestellt. Im Vollblut, im Urin, im Thymus, in der Niere und in der Milz stellten sich signifikante Erniedrigung der CsA Talspiegel nach der TX ein (**a1, b1, c1, d1, e1, f1**), wobei zugleich AM4N im Blut und Urin sowie in der Leber erhöht waren (**a2, b2, f2**). Im Nierengewebe zeigte sich jedoch eine gravierende Verschiebung der Konzentrationsverhältnisse, d.h. die Ratio cCsA Medulla / cCsA Cortex war über 300% erhöht gegenüber der unterdosierten Medikationskontrolle (nicht dargestellt).

Ausgeprägte Erhöhungen waren bei den SCrea, 8-IP und IL-2 Werten der TXL Ratten im Vergleich zu den MK Tieren NEO L erkennbar.

► Serum Creatinin, 8-IP im Urin und IL-2 im Plasma und Nierengewebe



**Abb.53** Vergleich der SCrea, 8-IP im Urin und IL-2 Plasma und Nierenspiegel der unterdosierten allotransplantierten Vergleichsgruppe (TXL) und der entsprechenden Medikationskontrolle NEO L (1mg/kg\*d) (n = 5,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , **a, b, c**  $p < 0.05$ ).

Die starke Erhöhung der SCrea und 8-IP Ausscheidungen weisen auf eine stark eingeschränkte und gestörte Nierenfunktion hin. Da die IL-2 Werte auch stark erhöht sind kann man von aktiven Abstoßungsprozessen bei dieser Dosierung ausgehen (s.a. Histologische Befunde 6.2.8)

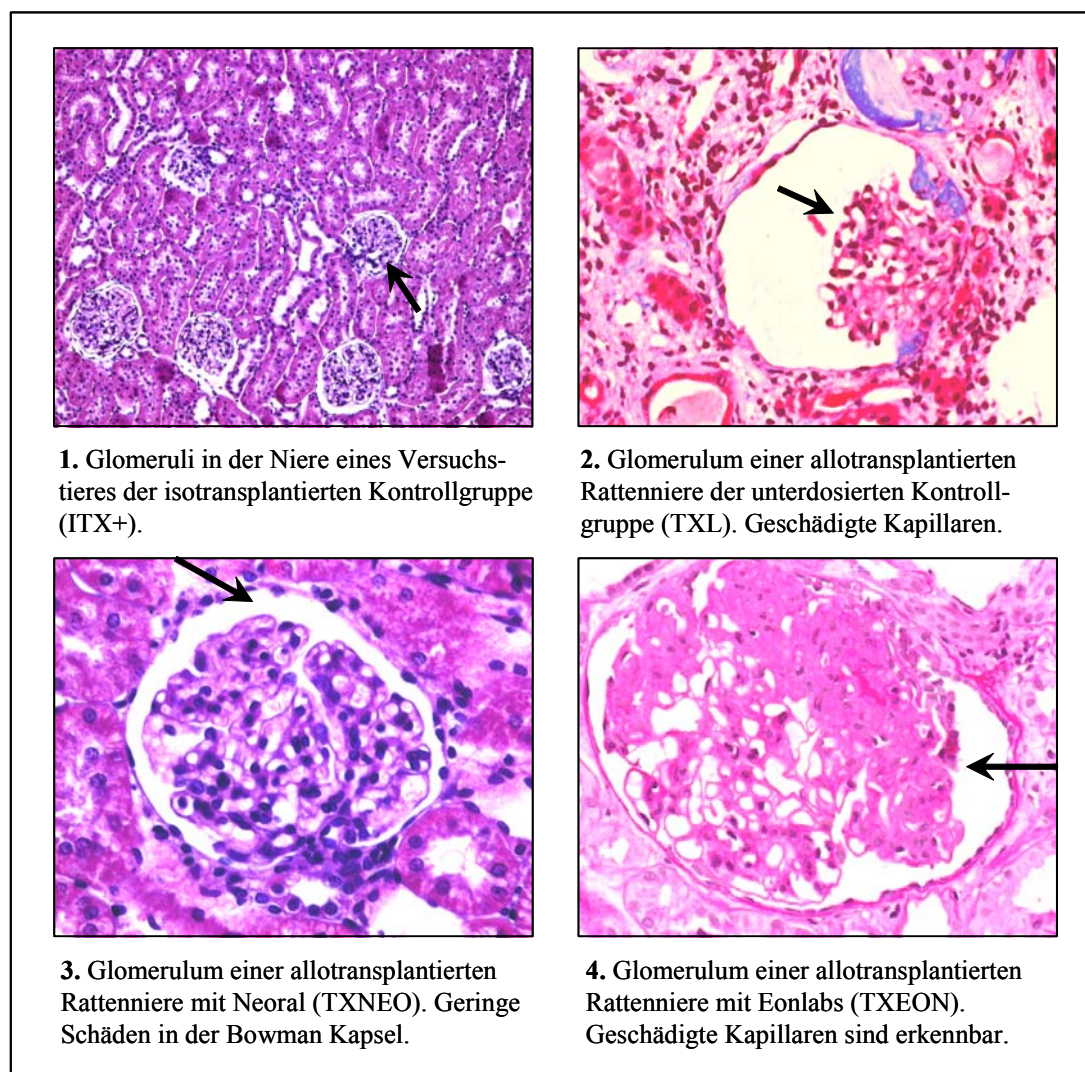
## 6.2.7 Histopathologie der Niere

Die histologische Beurteilung von Biopsie-Proben spielt eine große Rolle in der klinischen Diagnose von Abstoßungsprozessen nach Nierentransplantation. Ein wichtiger Faktor ist hierbei die Unterscheidung zwischen Nierenschäden die durch den Einsatz der CaN Inhibitoren bedingt sind und immunologischen Abstoßungsreaktionen. Die chronische Toxizität des CsA spielt erst ab mehreren Monaten bis Jahren eine entscheidende Rolle (Taube et al., 1985). Die meisten Fälle chronischer CsA Toxizität sind nachweislich auf zu hohe CsA Dosen über einen längeren Zeitraum hinweg zurückzuführen (Davies et al., 2000).

Die klinische histologische Diagnostik der Abstoßungsreaktionen von Nierentransplantaten beruht auf einer internationalen Konvention, der „Banff working classification of kidney transplant pathology“. Diese legt eine Einteilung in verschiedene Arten (z.B.

hyperakute-, akute- oder chronische Abstoßung) und Grade (z.B. chronische Abstoßungen Grad I-III) von Abstoßungsreaktionen fest (Solez *et al.*, 1993).

#### 6.2.7.1 Histologische Befunde der Transplantationsversuche : Glomeruli



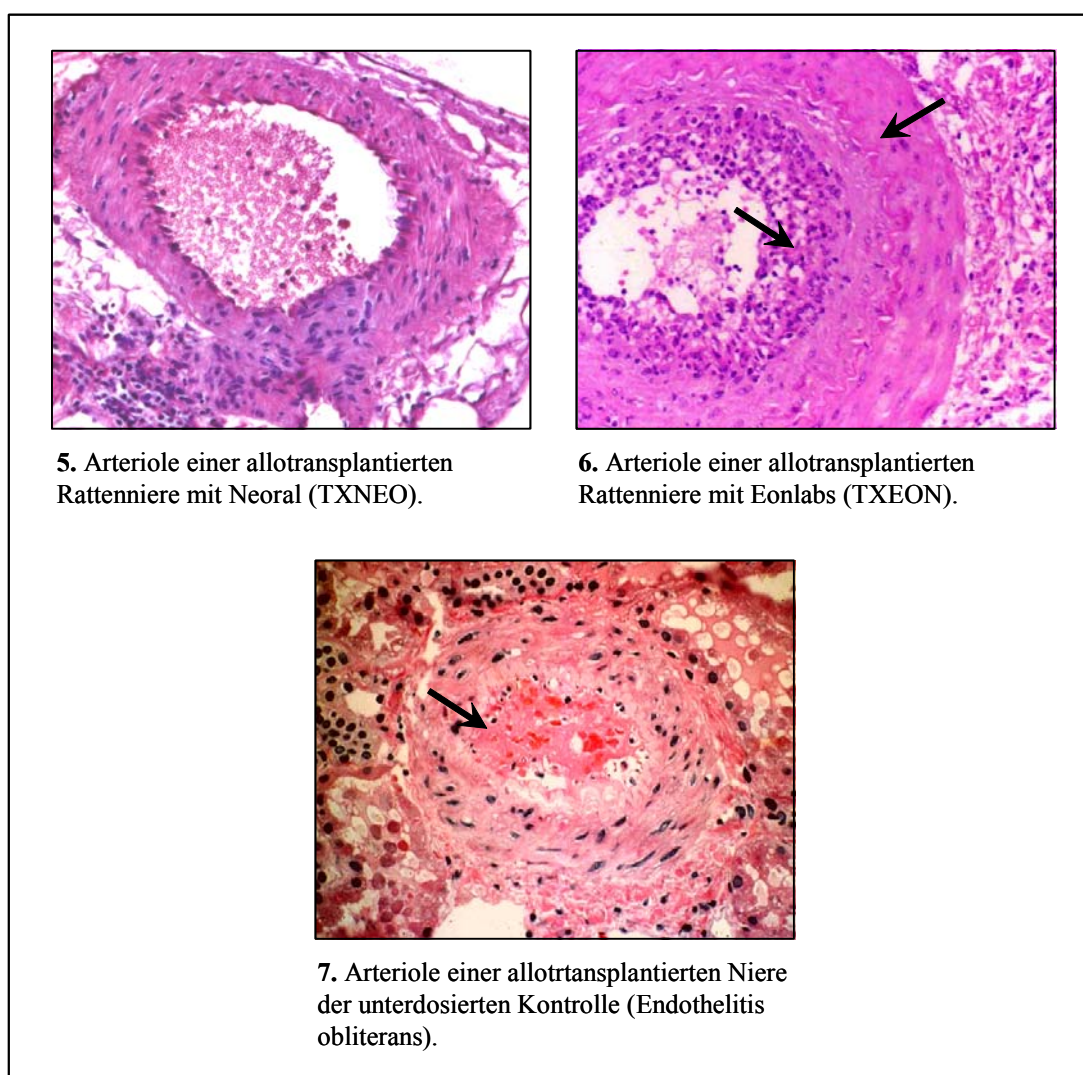
**Abb.54** 400-fache Vergrößerung von Glomeruli der Nieren der Transplantationsversuche

Die Isotransplantation verursachte keine erkennbaren Schäden an den Glomeruli der Nieren (Abb.54 1.). Das Gegenteil war der Fall bei der unterdosierten (1 mg/kg\*d) allotransplantierten Kontrollgruppe (Abb.54 2.). Die Kapillarschlingen in der Bowman Kapsel sind stark geschädigt und größtenteils nekrotisch, wodurch die glomeruläre Filtration stark eingeschränkt ist und harnpflichtige Substanzen im Plasma erhöht sind (s. Abb.53 SCrea). Die allotransplantierten Nieren der TXNEO Gruppe waren nur geringfügig geschädigt (Abb.54 3.). Ein vorhandener Spalt in der zwischen den Kapillarschlingen und dem innern bzw. äußeren Blatt der Bowman Kapsel könnte z.T. ein Artefakt sein. Die Kapillarschlingen sind vollständig intakt und zeigen keine morphologischen Veränderungen. Ein ähnliches Bild war bei den TXGEN Ratten



erkennbar, die hier nicht dargestellt sind. Größere Schäden waren in den Kapillaren der Glomeruli der TXEON Tiere nachweisbar (Abb.54 4.). Ein Teil des Spaltes zwischen Kapillaren und Kapsel sind hier wahrscheinlich ebenfalls artifiziell. Deutlich erkennbar sind im Gegensatz zu 3. durch Verstärkung der Basalmembran verdickte bzw. sklerotische Kapillaren, die sich über weite Bereiche der Kapillaren erstrecken (Fokale, segmentale Glomerulosklerose). Entsprechend diesem Befund sind die Serum Creatinin Spiegel im Vergleich zu TXNEO (s. 6.2.3 Abb.47) signifikant erhöht.

#### 6.2.7.2 Histologische Befunde der Transplantationsversuche : Arteriolen

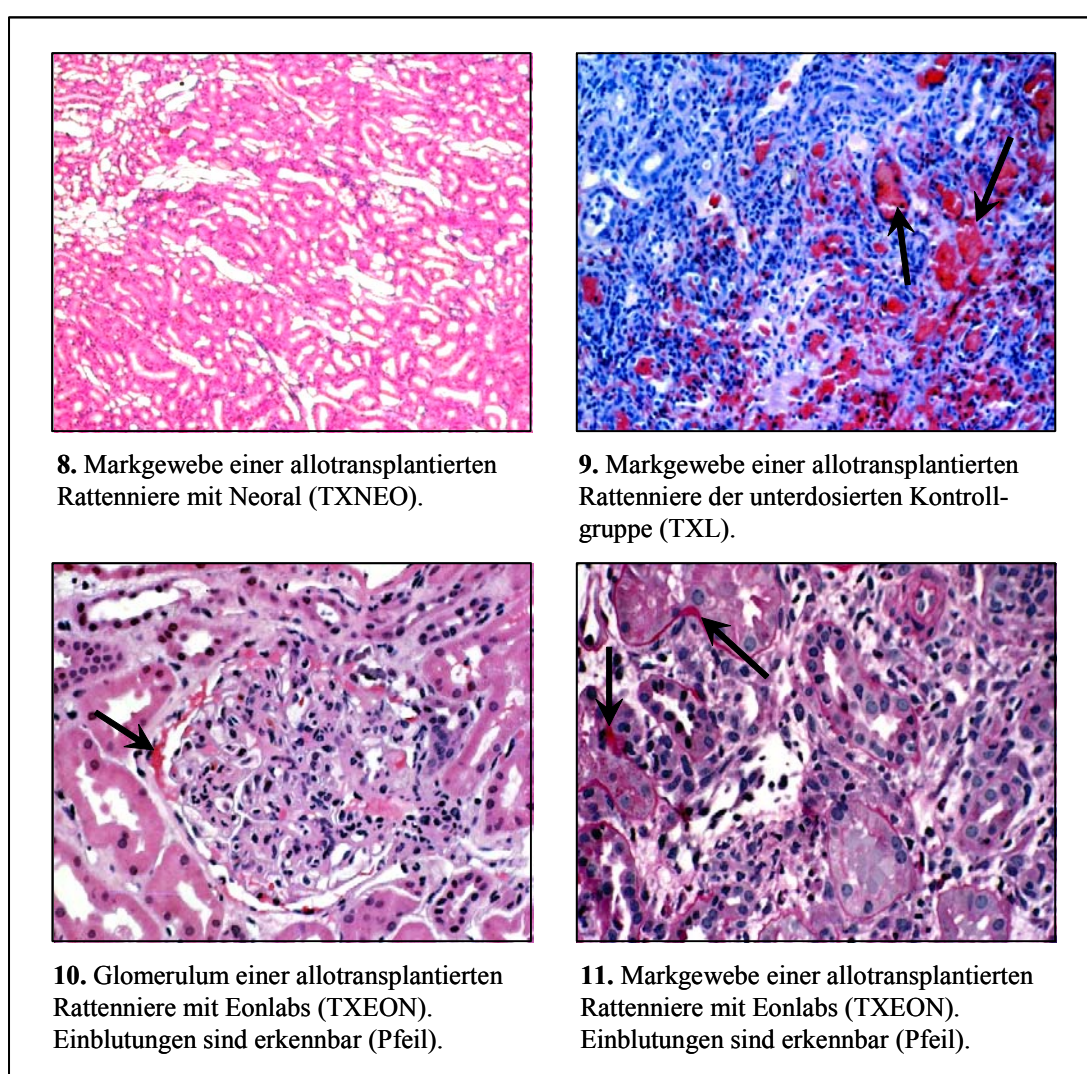


**Abb.55** 400-fache Vergrößerung von Arteriolen der Niere der Transplantationsversuche

Die Arteriole der Niere einer Ratte der TXNEO Gruppe (Abb.55 5.) wies keine strukturellen Veränderungen auf nach 6 Wochen. Deutlich sichtbar ist die Muscularis bzw. das Endothel, die keine pathologischen Veränderungen zeigen. Im Kontrast dazu steht die Arteriole einer Niere aus der TXEON Gruppe (Abb.55 6.). Man erkennt

typische Merkmale einer progredienten Schädigung dieses Gefäßes aufgrund von Abstoßungsreaktionen: Stark angeschwollene Endothelzellen mit Neutrophilen Infiltration, sowie eine fibrinoide Verdickung der gesamten Gefäßwand. Das Lumen der Arteriole hat sich bereits merklich verringert und würde in der Folge komplett verschlossen werden (Endothelialitis obliterans), wie man es bei Nr.7 (Abb.55), der unterdosierten Kontrolle, gut erkennen kann. Das Lumen dieser Arteriole ist vollständig durch einen Fibrin Thrombus verschlossen. Dieses Krankheitsbild wird sehr häufig bei akuten Abstoßungsprozessen beobachtet, da die Arteriolen die primären Kontaktstellen des Transplantats mit dem Wirtsorganismus darstellen (*Gupta et al., 1999*) und somit als erste von der Immunabwehr abgegriffen werden.

### 6.2.7.3 Histologische Befunde der Transplantationsversuche : Nierenmark



**Abb.56** 100- (8., 9.) und 400-fache (10., 11.) Vergrößerung Strukturen des Nierenmarks bzw. eines Glomerulums der Nieren der Transplantationsversuche

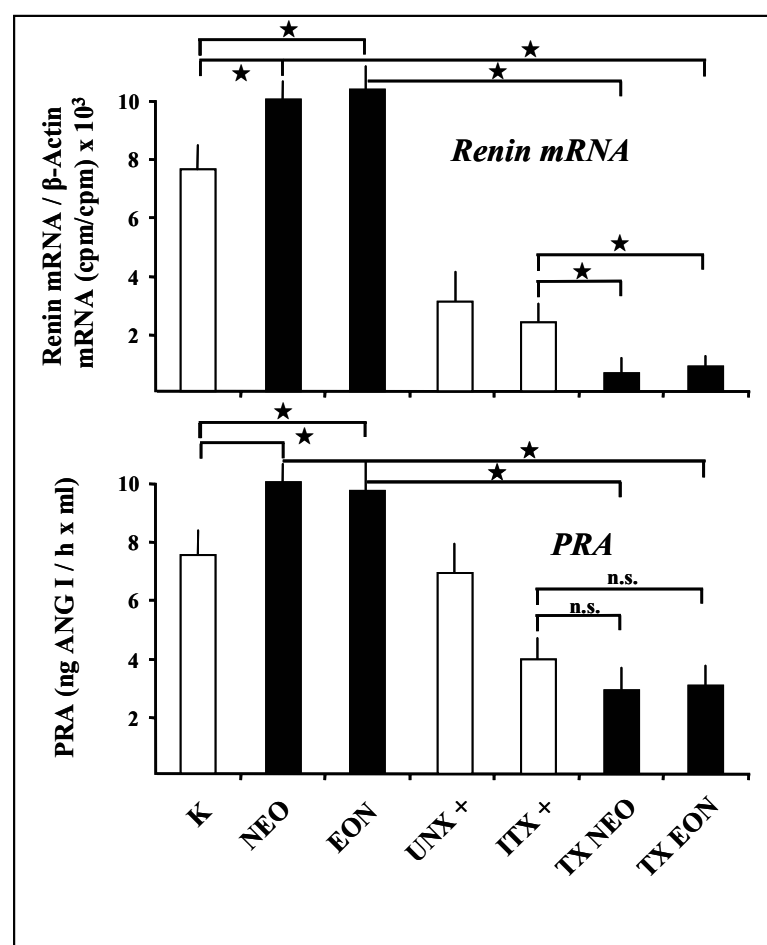
In der Regel treten Schädigungen im Nierenmark, hervorgerufen durch CsA selbst oder durch Immunreaktionen, erst nach längeren Zeiträumen auf. Primäre Schäden sind, wie

bereits beschrieben, vornehmlich an den Glomeruli und Arteriolen zu erwarten. Als Schäden die das Nierenmark betreffen sind vor allem interstitielle Inflammationen mit Infiltrationen von mononukleären Immunzellen, Neutrophilen sowie Eosinophilen und Tubulitis anzuführen. Das Mark einer allotransplantierten Rattenniere der TXNEO Gruppe (Abb.56 8.) zeigt keine pathologischen Veränderungen, hingegen sind bei der unterdosierten Gruppe gravierende Schäden im Sinne von deutlichen Einblutungen und Atrophie bzw. Entzündungen der Tubuli zu erkennen (Abb. 56 9.). Das Markgewebe der TXEON Ratte lässt eine Tubulitis und eine Infiltration mit Neutrophilen erkennen (Abb.56 11.). Weitere Symptome waren hier zudem (10, 11) Einblutungen in das Interstitium bzw. im Falle von Nr.10 in die Bowman Kapsel als Folge von Kapillarschäden.

### 6.2.8 Bestimmung der Änderung verschiedener Genexpressionen in den Nieren der Versuchstiere

Bei der Analytik der Genexpressionen wurden die mit Gengraf<sup>®</sup> behandelten Versuchstiere (GEN, TXEON) ausgespart, da sich aus den Nierenfunktionsparametern (s.6.2.3), sowie den CsA und dessen Metaboliten Konzentrationen (s.6.2.1 bzw. 6.2.2) keine Unterschiede zu den mit Neoral behandelten Ratten ableiten ließen.

#### 6.2.8.1 Quantifizierungen der mRNA des Renins und der Plasmareninaktivität (PRA)



Die im sauren pH Optimum aktive Protease Renin ist ein Schlüsselenzym des RAS.

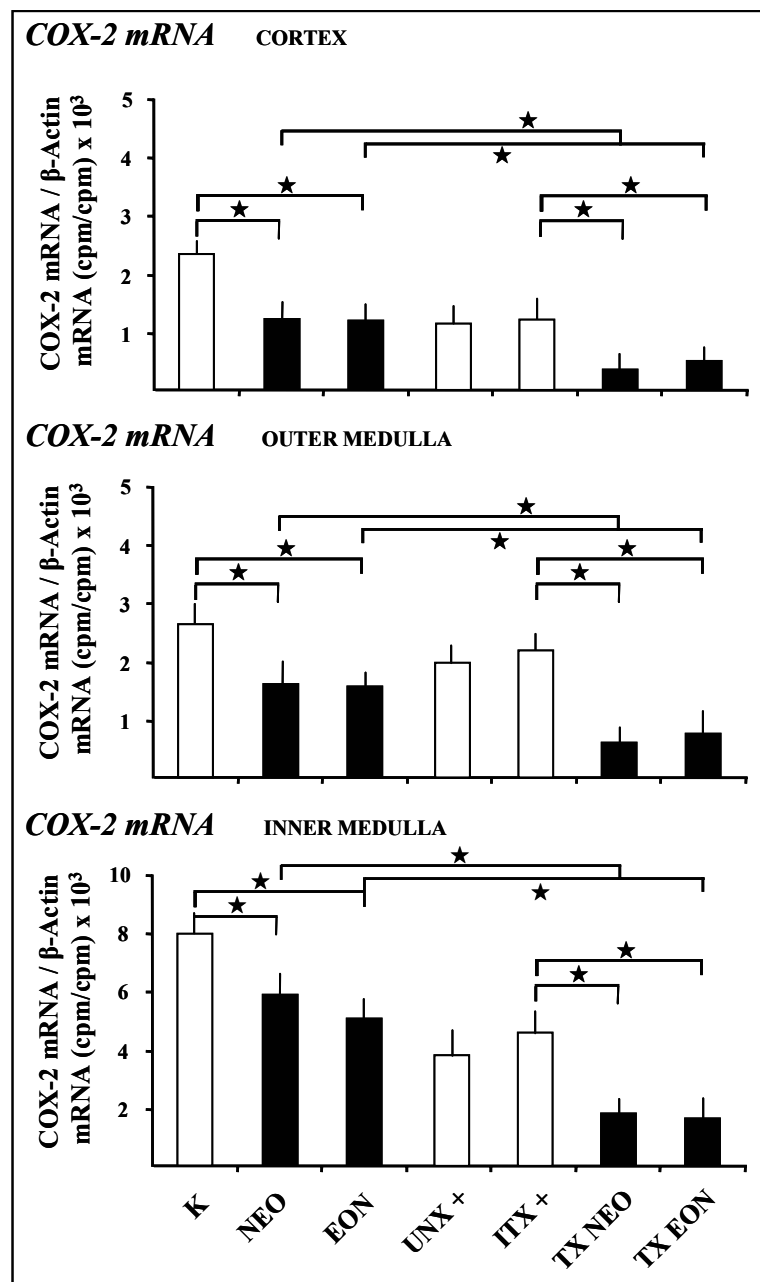
Die Renin mRNA Genexpression war nach 6 Wochen reiner Medikation (NEO und EON) signifikant erhöht im Nierencortex der Versuchstiere verglichen mit dem Kontrollkollektiv (K). Die Nephrektomie (UNX+) sowie die Isotransplantation (ITX+) erniedrigten die Reninexpression signifikant (nicht eingezeichnet). Die Allotransplantation (TXNEO, TXEON) führte zu einem weiteren signifikanten Absinken der Renin mRNA.

**Abb.57** Änderung der Renin mRNA in den Nieren und PRA der Versuchstiere (x = ± SEM, n = 6, ★ = p < 0.05) nach 6 W.

Bei der Betrachtung der PRA erkennt man im Wesentlichen die gleichen Unterschiede wie bei den mRNA Daten des Renins. Eine Ausnahme stellt die PRA der ITX+ Tiere dar, die sich nicht signifikant von den Allotransplantierten Tieren unterschied.

#### 6.2.8.2 Cyclooxygenase-2 mRNA Genexpression in den Nieren

Eine vermeindlich wichtige Rolle bei der Synthese und Freisetzung des Renins spielt die induzierbare Isoform der Cyclooxygenase, die COX-2. Die Genexpression der COX-2 mRNA wurde in den makroskopisch unterscheidbaren Nierenzonen Cortex, äußeres Mark (outer Medulla) und inneres Mark (inner Medulla) vermessen.



Die erhaltenen Ergebnisse unterschieden sich nicht in den einzelnen Nierenzonen. Nach CsA Gabe (10 mg/kg\*d) konnte man eine deutliche Verminderung der COX-2 mRNA Expression in den Nieren der NEO und EON Tiere nachweisen. Zusätzlich zeigten die TXNEO bzw. TXEON Ratten eine weitere Absenkung im Vergleich mit den MK sowie ITX+ Tieren. Die Isotransplantation (ITX+) führte zwar zu einer Reduzierung der COX-2 Expression, jedoch konnten keine Unterschiede zu den MK Tieren festgestellt werden.

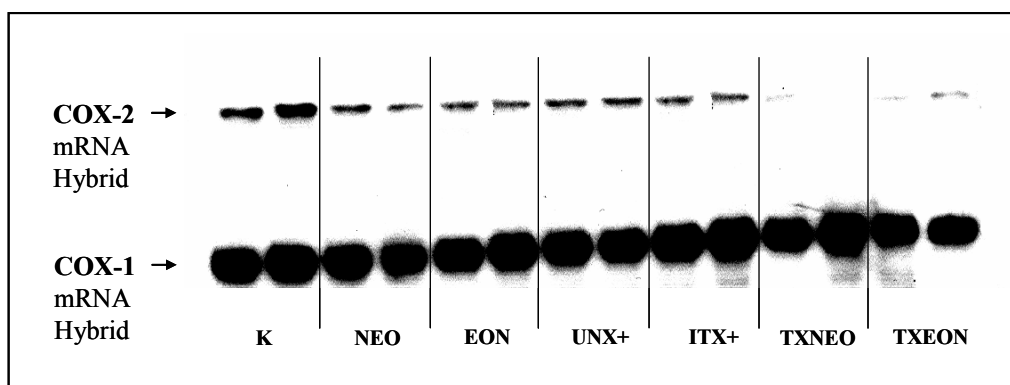
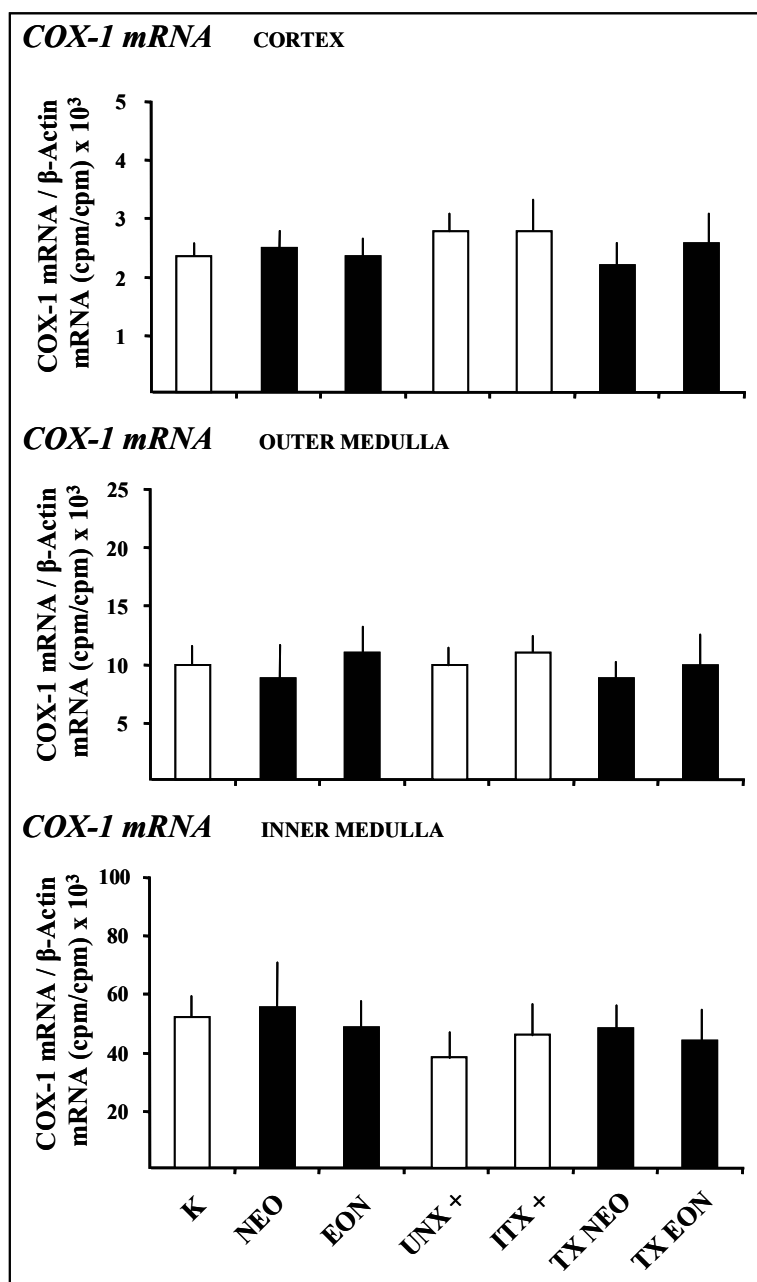
**Abb.58** Änderung der COX-2 mRNA Expression in den Nieren der Versuchstiere (x = ± SEM, n = 6, ★ = p < 0.05) nach 6 W.

### 6.2.8.3 Cyclooxygenase-1 mRNA Genexpression in den Nieren

Die konstitutionelle Isoform der Cyclooxygenase, die COX-1, wurde ebenfalls in den Nierenzonen bestimmt. Nach 6 Wochen konnten jedoch in keiner Nierenzone bei keiner Versuchstiergruppe signifikante Unterschiede in der COX-1 Genexpression festgestellt werden.

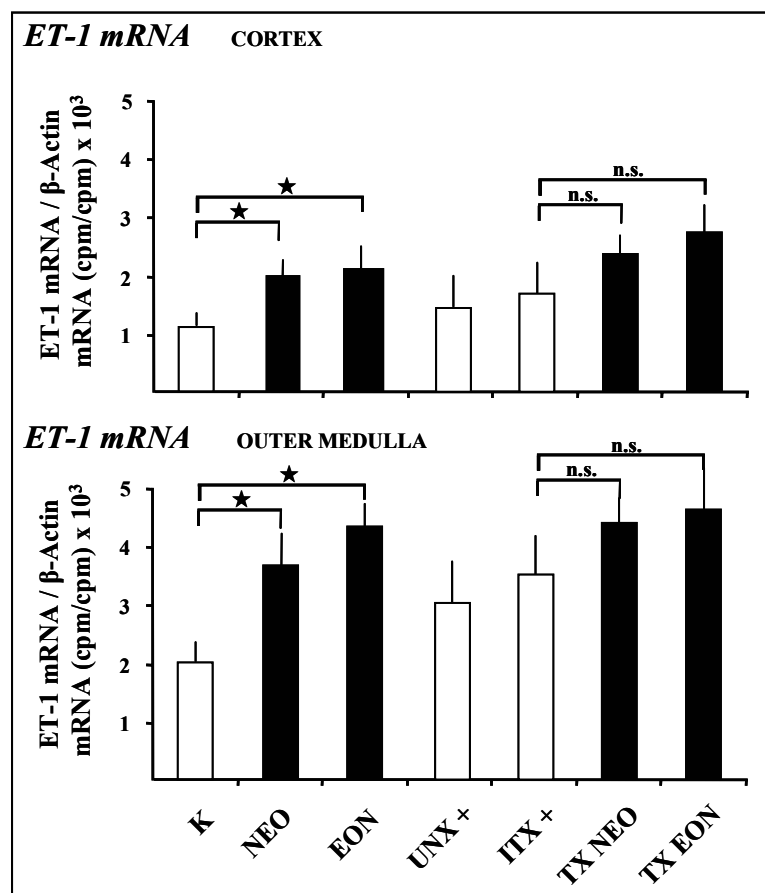
**Abb.59** rechts: Expression der COX-1 mRNA in den Nieren der Versuchstiere ( $x \pm \text{SEM}$ ,  $n = 6$ , nach 6 W.

unten: Ausschnitt der Banden des RNase Protection-Assays für die COX-1 und -2 mRNA.



#### 6.2.8.4 Genexpression der Endotheline -1 und -3 in den Nieren

Die Endotheline (ET) zählen neben den Katecholaminen und dem Angiotensin-II zu den wirksamsten physiologischen Vasokonstriktoren. Sie stellen eine Familie von 3 Peptiden mit je 21 Aminosäuren dar (*Firth et al, 1995*) und sie stehen im Verdacht eine wichtige Rolle in der Transplantat bedingten bzw. CsA verursachten Nephrotoxizität zu spielen.



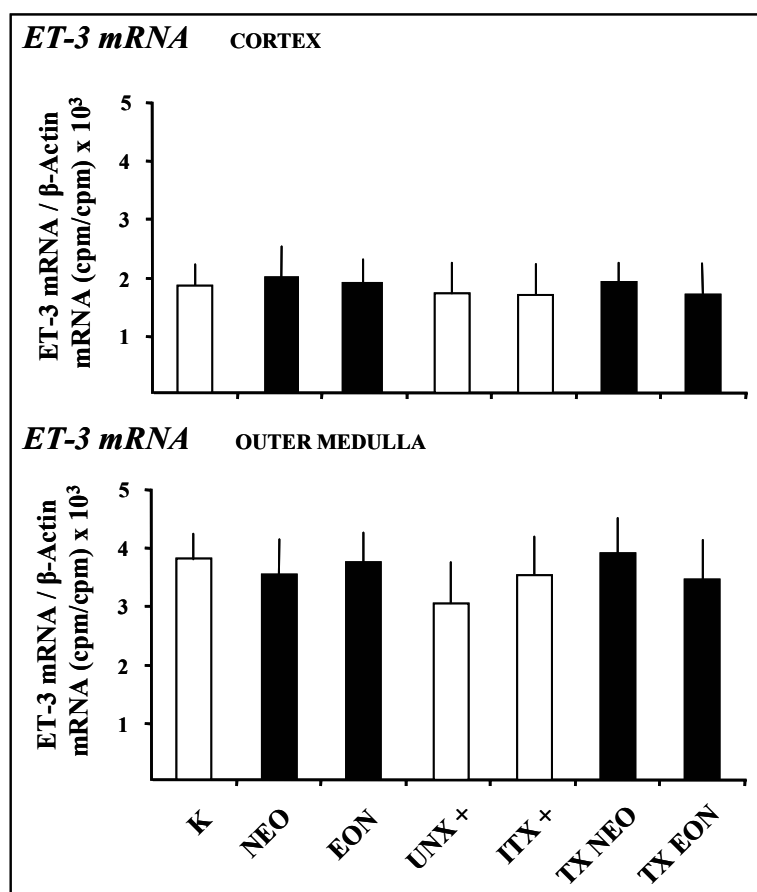
Die Änderungen der ET-1 mRNA Genexpression waren im Nierencortex und in der äußeren Medulla ähnlich. CsA (NEO, EON) verursachte einen Anstieg der ET-1 mRNA verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren (K). Nach Allotransplantation stieg die ET-1 Genexpression ebenfalls signifikant an gegenüber den Kontrolltieren (nicht eingezeichnet). Aufgrund der Streuungen der Messwerte konnten keine signifikanten Erhöhungen bei den OPK (UNX+, ITX+) verglichen mit K bzw. mit TXNEO und TXGEN beobachtet werden.

**Abb.60** Änderung der ET-1 mRNA Expression in den Nieren der Versuchstiere ( $x \pm \text{SEM}$ ,  $n = 6$ , ★ =  $p < 0.05$ ) nach 6 W.

Die Genexpression des ET-3 hingegen wurde in der Niere sowohl nicht durch das CsA, als auch nicht durch die Allotransplantation verändert (Abb.61). Somit muss man die potentiellen nephrotoxischen Wirkungen der Endotheline dem ET-1 zuordnen.

Jedoch kann man in diesem Zusammenhang die Änderungen der Genexpressionen der Endothelin Rezeptoren nicht außer Acht lassen.

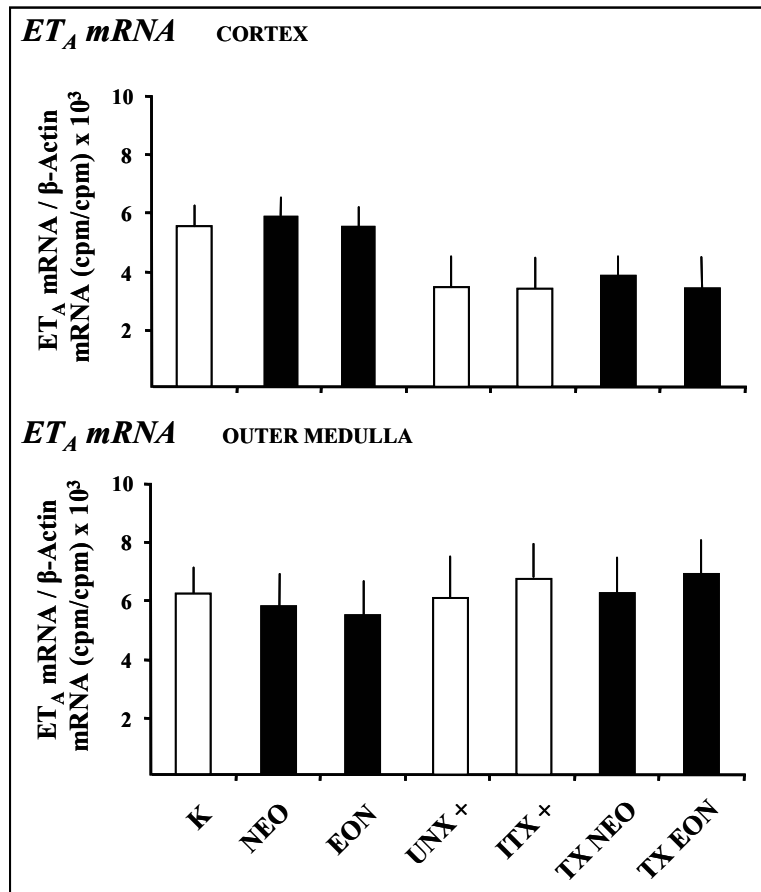




**Abb.61** Änderung der ET-3 mRNA Expression in den Nieren der Versuchstiere ( $x \pm \text{SEM}$ ,  $n = 6$ ,) nach 6 W.

#### 6.2.8.5 Genexpression der Endothelin Rezeptoren $\text{ET}_A$ und $\text{ET}_B$ in den Nieren

Die ET entfalten ihre vasokonstriktorische Wirkungen über  $G_q$ -Protein gekoppelte Membranrezeptoren an den Zielzellen (z.B. glatte Gefäßmuskelzellen).  $\text{ET}_A$  vermittelt hauptsächlich Vasokonstriktion,  $\text{ET}_B$  kann auch eine Vasodilatation über NO Freisetzung bewirken (Rubanyi, 1994). In der Niere kann dieses System u.a. durch Vasokonstriktion die Nierenperfusion reduzieren und somit die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) erniedrigen. Der  $\text{ET}_A$  Rezeptor wird im Nierencortex nur sehr gering exprimiert, dafür aber mehr in der Medulla. Der  $\text{ET}_B$  Rezeptor wird in der Niere generell in höherem Maße als der  $\text{ET}_A$  Rezeptor exprimiert, wobei auch hier der größere Anteil im Nierenmark vorliegt.

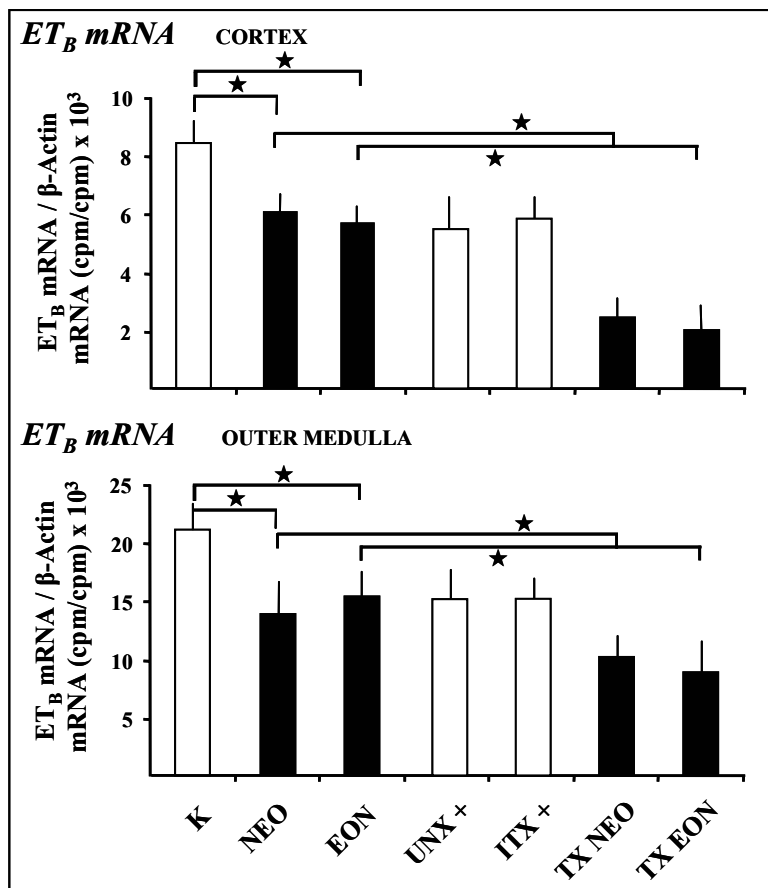


Die Genexpression des ET<sub>A</sub> Rezeptors wurde über die Dauer von 6 Wochen bei keiner Versuchstiergruppe signifikant verändert.

**Abb.62** Änderung der ET<sub>A</sub> mRNA in den Nieren der Versuchstiere ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ,  $n = 6$ , ★ =  $p < 0.05$ ) nach 6 W.

Deutliche Veränderungen stellten sich bei der Genexpression des ET<sub>B</sub> Rezeptors in der Niere ein. Das CsA verursachte eine Reduzierung der mRNA (NEO und EON). Eine weitere Absenkung der Expressionsrate der ET<sub>A</sub> mRNA stellte sich nach Allotransplantation (TXNEO und TXEON) ein. Die Isotransplantation (ITX+) bewirkte keine derartige Reduzierung.

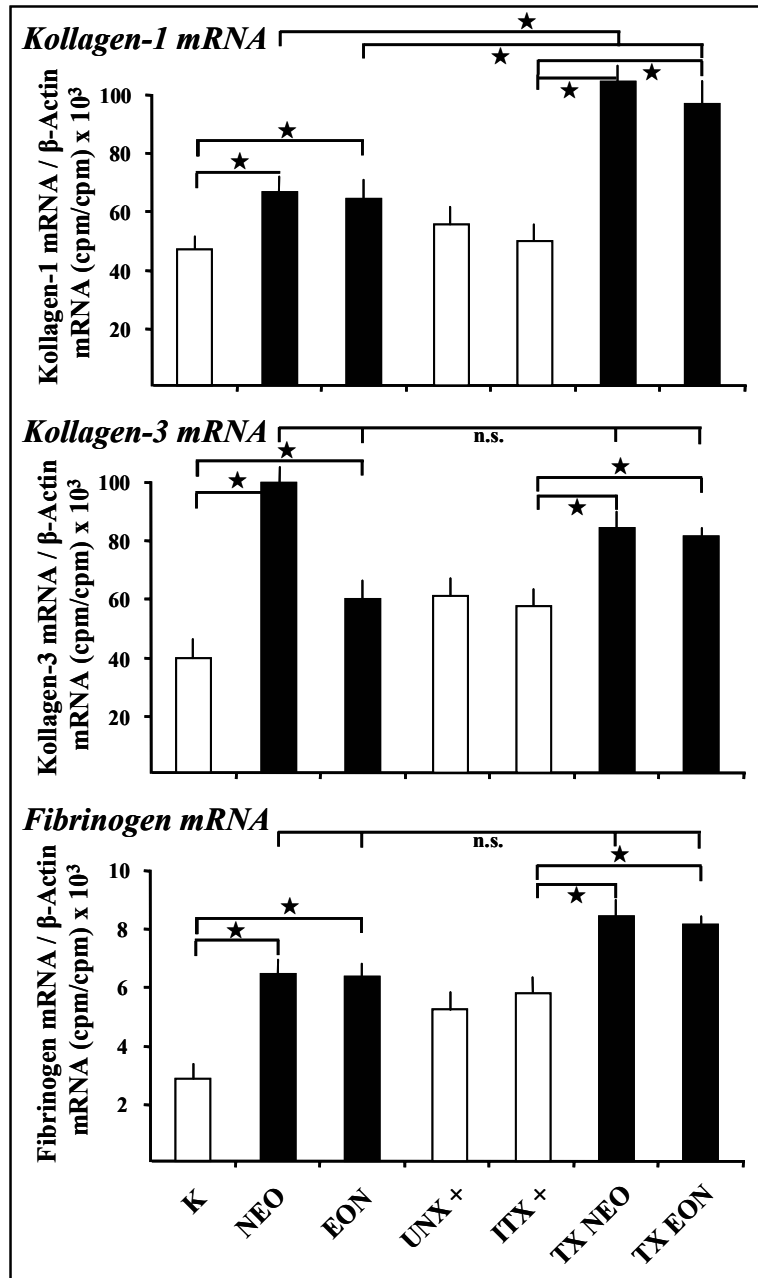
**Abb.63** Änderung der ET<sub>B</sub> mRNA in den Nieren der Versuchstiere ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ,  $n = 6$ , ★ =  $p < 0.05$ ) nach 6 W.





#### 6.2.8.6 Genexpression der Kollagene-1, -3 und Fibrinogen

Um mögliche morphologische Veränderungen in den Nieren zu erfassen wurde die Genexpression der Hypertrophiemarker Kollagen-1, Kollagen-3 und Fibrinogen untersucht.



**Abb.64** Änderung der mRNA der Kollagene-1 und -3, sowie des Fibrinogens in den Nieren der Versuchstiere ( $x \pm \text{SEM}$ ,  $n = 6$ ,  $\star = p < 0.05$ ) nach 6 W.

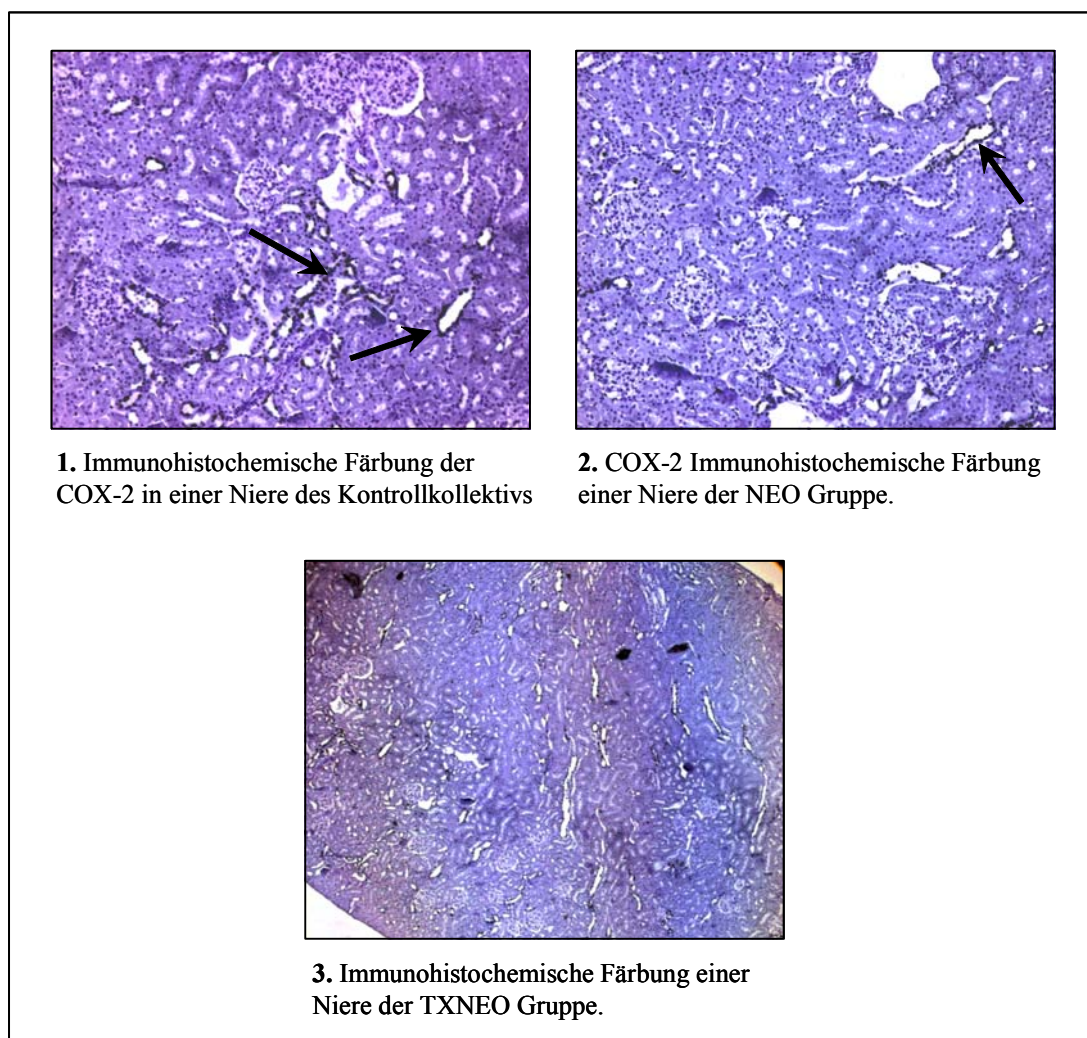
Die Kollagen-1 mRNA Expression war nach 6 Wochen reiner Medikation (NEO, EON) deutlich erhöht. Nach Allotransplantation war ein weiterer signifikanter Anstieg zu verzeichnen.

Interessanterweise änderte die CsA Therapie die Genexpression des Kollagen-3 unterschiedlich bei den NEO und EON Tieren. Mehr mRNA waren in den Nieren der NEO Ratten detektierbar. Die mRNA Expression des Kollagens-3 war zwar nach Allotransplantation höher als bei K, es bestand aber kein signifikanter Unterschied zu den Werten der NEO bzw. EON Tiere.

Das gleiche Bild bietet sich beim Betrachten der mRNA Daten des Fibrinogens. Eine Erhöhung der Genexpression des Fibrinogens findet durch das CsA alleine und nach Allotransplantation in gleichem Ausmaße statt.

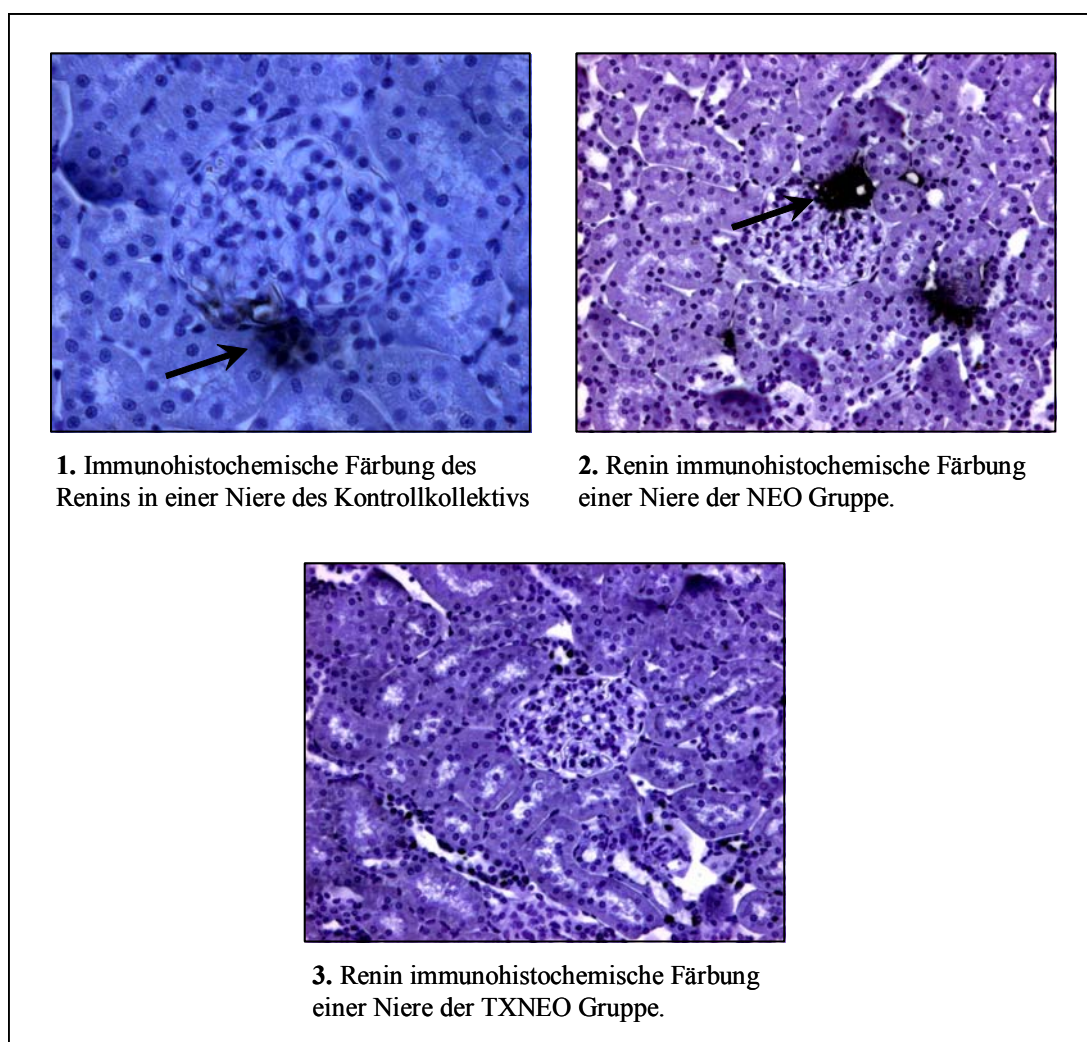
### 6.2.8.7 Immunohistochemische Färbungen: COX-2 und Renin

Zur Bestätigung, sowie zur genauen Lokalisation der Ergebnisse der mRNA Genexpression von Renin und COX-2 wurden immunohistochemische Färbungen der jeweiligen Proteine durchgeführt.



**Abb.65** Immunohistochemische Färbungen der COX-2 in Nierenschnitten der unbehandelten Kontrolltiere, der Medikationskontrolle und nach Allotransplantation.

Die Ergebnisse zur mRNA Expression der COX-2 (s.6.2.9.2) konnten durch die immunohistochemische Färbung des Proteins bestätigt werden (Abb.65). Die Nieren der unbehandelten Kontrolltiere (1.) besitzen deutlich mehr COX-2 als die Nieren nach CsA Behandlung (2.). Nach Allotransplantation ist nach 6 Wochen immunohistochemisch praktisch keine COX-2 mehr nachweisbar (3.).



**Abb.66** Immunohistochemische Färbungen des Renins in Nierenschnitten der unbehandelten Kontrolltiere, der Medikationskontrolle und nach Allotransplantation.

Die Daten zur mRNA Genexpression des Renins (s. 6.2.9.1) deckten sich mit den Ergebnissen der immunohistochemischen Färbungen der Nierenpräparate (Abb.66). Das Renin lässt sich immunohistochemisch im Cortex, genauer in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere anfärben. Nach CsA Therapie (2.) steigen die Reninkonzentrationen in der Niere im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (1.) an. Die Allotransplantation bewirkt eine deutliche Reduzierung der Reninexpression (3.).

✓ Zusammenfassung der histologischen Befunde und der Ergebnisse der Untersuchungen zu den mRNA Expressionen:

- 6 Wochen nach Isotransplantation mit Medikation (ITX+) war die Histologie der Rattennieren unauffällig.
- Die unterdosierte allotransplantierte Gruppe (TXL) lässt gravierende morphologische Schäden an den Glomeruli, den Arteriolen, sowie den Tubuli erkennen.

- Milde Beeinträchtigungen finden sich in den Nieren der TXNEO Gruppe, Abstoßungsvorgänge kann man bei den Nieren der TXEON Gruppe deutlich erkennen.
- Die PRA, sowie die Renin mRNA Expression steigen nach 6 wöchiger Medikation signifikant an. Isotransplantation mit Medikation (ITX+) erniedrigt beide Parameter, die Allotransplantation reduziert die Aktivität, sowie die Genexpression des Renins noch weiter.
- Die mRNA Expression der COX-2 fällt nach Applikation von CsA nach 6 Wochen deutlich ab. Ähnlich dem Renin, ist dieser Effekt nach Allotransplantation verstärkt vorhanden und reduziert die COX-2 mRNA noch weiter.
- Die Genexpression der COX-1 ist bei keiner Gruppe am Ende der Versuchsdauer verändert gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren.
- Die Gehalte an ET-1 mRNA nehmen in gleichem Maße einerseits durch die CsA Therapie, andererseits durch die Allotransplantation zu. Dagegen wird die Genexpression des ET-3 in keinem Versuchstier verändert.
- Die Expression der Endothelinrezeptoren wird nur im Falle des ET<sub>B</sub> Rezeptors verändert. Seine mRNA Expression nimmt unter CsA Gabe signifikant ab, wobei auch hier die Allotransplantation diesen Effekt verstärkt.
- Die Genexpression der Hypertrophiemarker Kollagen-1 und -3, sowie Fibrinogen zeigt nach CsA Applikation, sowie nach Allotransplantation signifikante Erhöhungen verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren. Die mRNA Genexpression des Kollagens-1 war zudem nach Allotransplantation signifikant höher als nach reiner Medikation. Dieser Effekt trat bei den Expression des Kollagens-3 und des Fibrinogens nicht auf. Eine weitere Ausnahme bildet die Expression des Kollagens-3 nach 6 Wochen Applikation von Neoral (NEO), die stärker ausgeprägt war als bei den EON Tieren.
- Die Befunde reduzierter mRNA Expression des Renins und der COX-2 konnten mit immunohistochemischen Färbungen der entsprechenden Proteine in histologischen Schnitten semiquantitativ bestätigt werden.
- Die Befunde der mRNA Untersuchungen zeigen signifikante Unterschiede, die nach Allotransplantation bzw. CsA Therapie im Vergleich zu einem unbehandelten Kollektiv auftreten. Sie erlauben jedoch keine Differenzierung zwischen NEO und EON bzw. TXNEO und TXEON, mit Ausnahme des Kollagens-3.

### 6.3 Pharmakokinetische Untersuchungen an nichttransplantierten Ratten

Die Pharmakokinetik und die Bioverfügbarkeit des CsA sind stark betroffen von inter- aber auch intraindividuellen Schwankungen. Die neuartige Galenik des Sandimmun Neoral<sup>®</sup> führte zu einer deutlichen Reduzierung der Schwankungsbreite und bereitete damit der immunsuppressiven Therapie eine konstantere Basis. Vergleichende pharmakokinetische Untersuchungen sind ein Muss bei der Arzneimittelzulassung von Generika, wobei sich die häufigste Kritik gegen die ausschließliche Verwendung von gesunden Probanden richtet. Die pharmakokinetischen Verhältnisse in organtransplantierten Patienten sind auf vielfache Weise (z.B. multiple Co-Medikation, veränderter metabolischer Status aufgrund eingeschränkter Nierenfunktion etc.) verändert gegenüber gesunden Probanden.

#### 6.3.1 Konzentrations-Zeitverläufe des CsA im Blut, in der Niere, der Leber, im Thymus und in der Milz

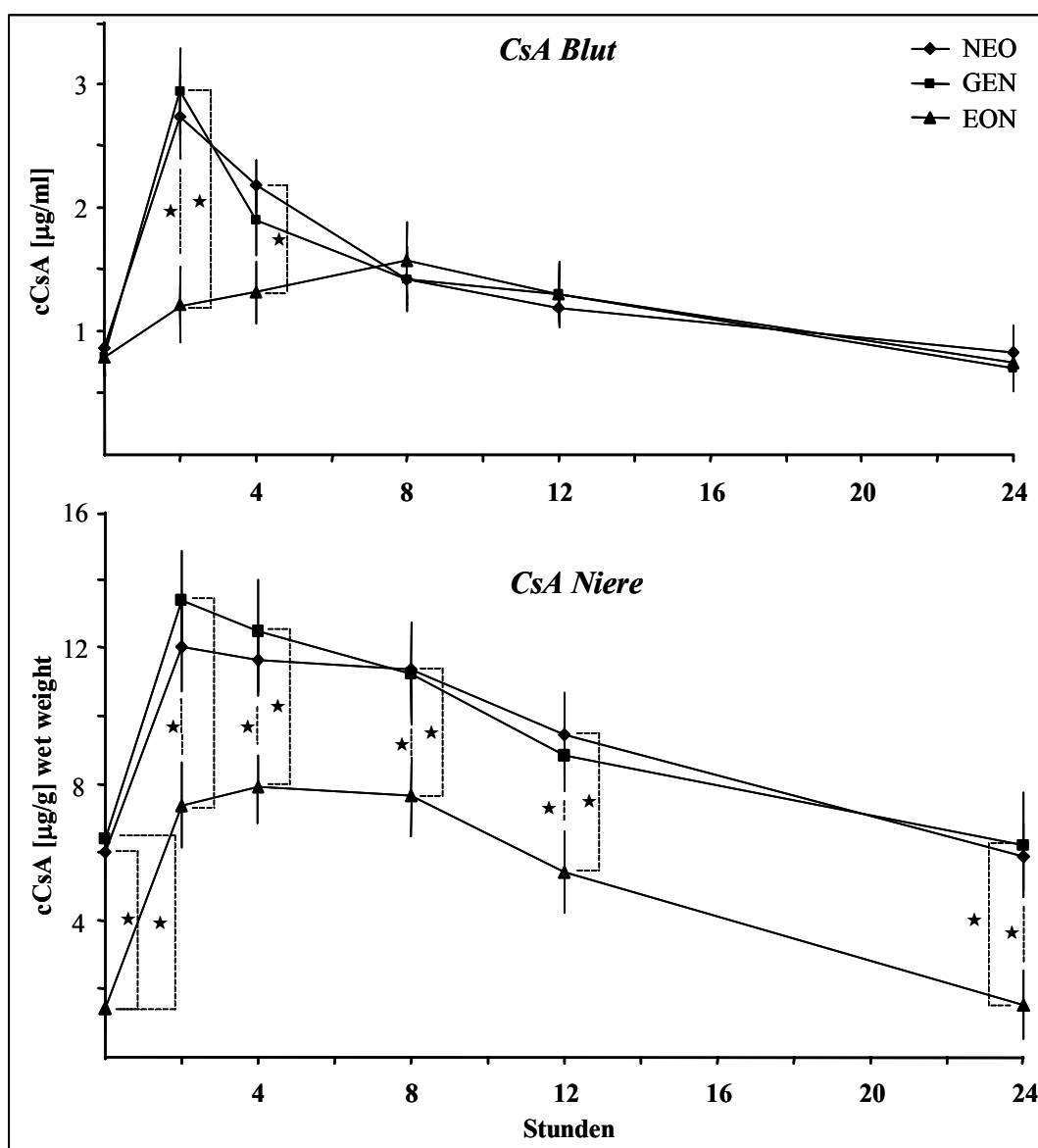
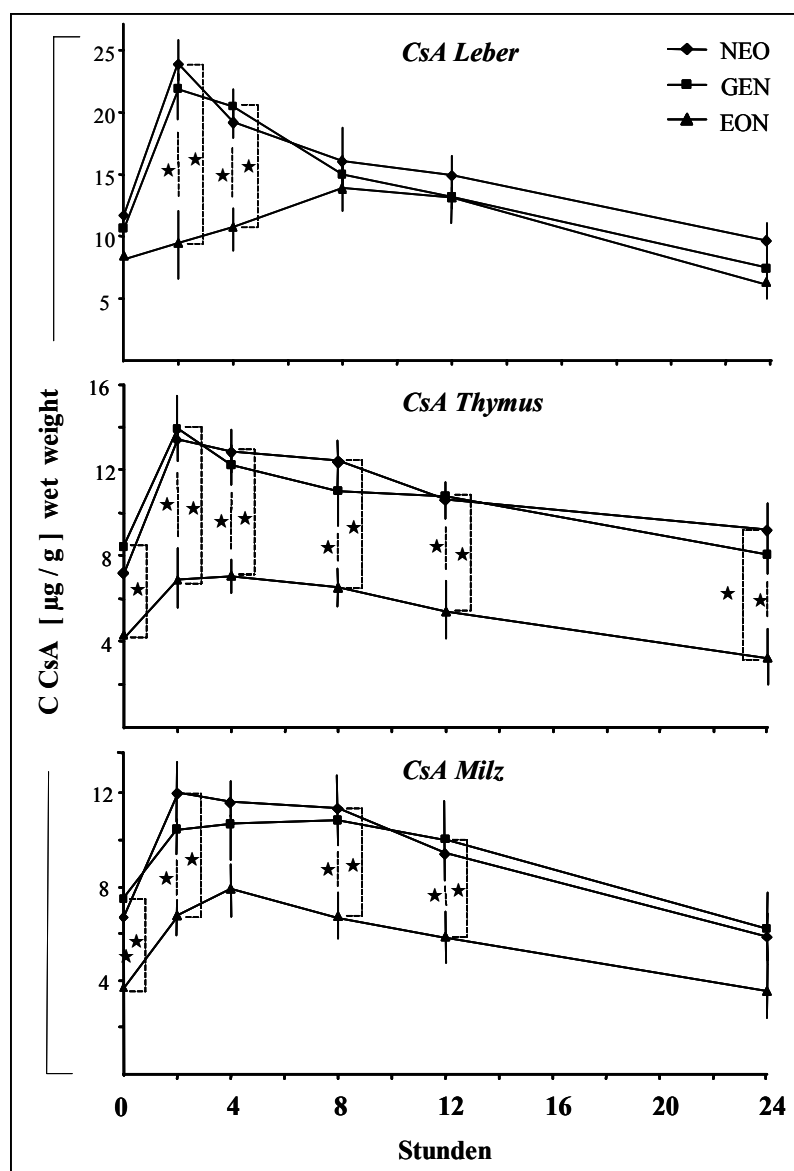


Abb. 67 CsA Pharmakokinetik im Blut und in der Niere (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , ★ p < 0.05)

Der CsA Konzentrationsverlauf im Blut offenbarte deutliche Unterschiede im Vergleich NEO bzw. GEN zu EON. Die  $T_{\max}$  bzw.  $C_{\max}$  Werte waren signifikant verschieden, somit besitzt EON ein völlig anderes Anflutungsprofil. Die AUC unterschied sich jedoch nicht signifikant in diesem Kompartiment. In der Niere waren diese Unterschiede verstärkt vorhanden, was sich auch in den entsprechenden AUCs niederschlug (Tab.06 S.116)



Im Lebergewebe fanden sich die höchsten absoluten Konzentrationen, wobei der Konzentrationsverlauf im Wesentlichen dem im Blut entsprach. In der Absorptionsphase (0-4h) besaß EON ein flacheres Anflutungsprofil als NEO und GEN.

In den immunkompetenten Organen Thymus und Milz besaß EON jeweils deutlich signifikant erniedrigte CsA Konzentrationen (AUC).

**Abb. 68** CsA Pharmakokinetik in verschiedenen Organen (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , ★ p < 0.05)

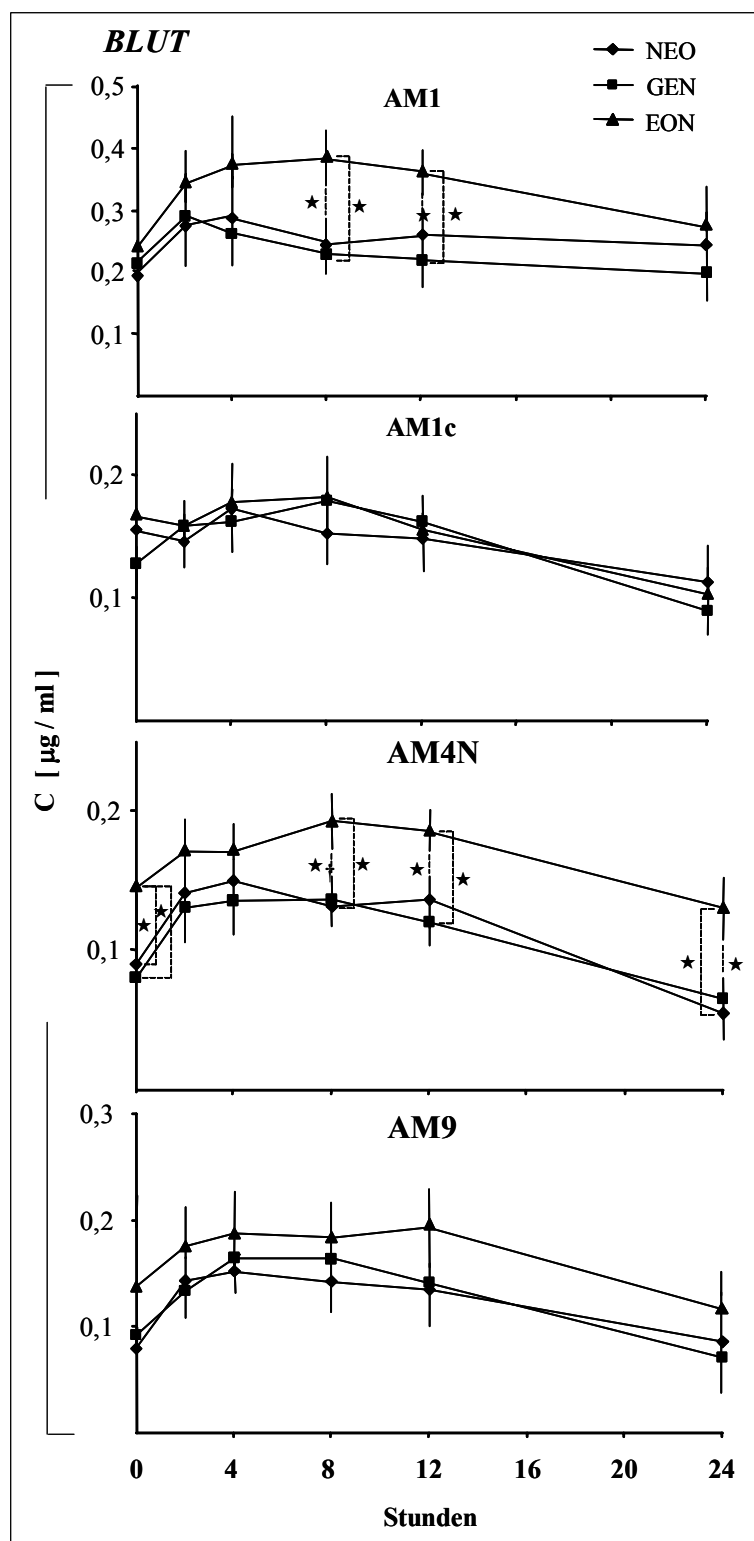
### 6.3.2 Zeitverlauf des Auftretens der Metaboliten des CsA im Blut und in den Organen

#### ► Konzentrations-Zeit Kurven der CM im Vollblut

Bis auf die CM AM1 und AM4N waren im Blut keine Auffälligkeiten zwischen den Pharmaka erkennbar.

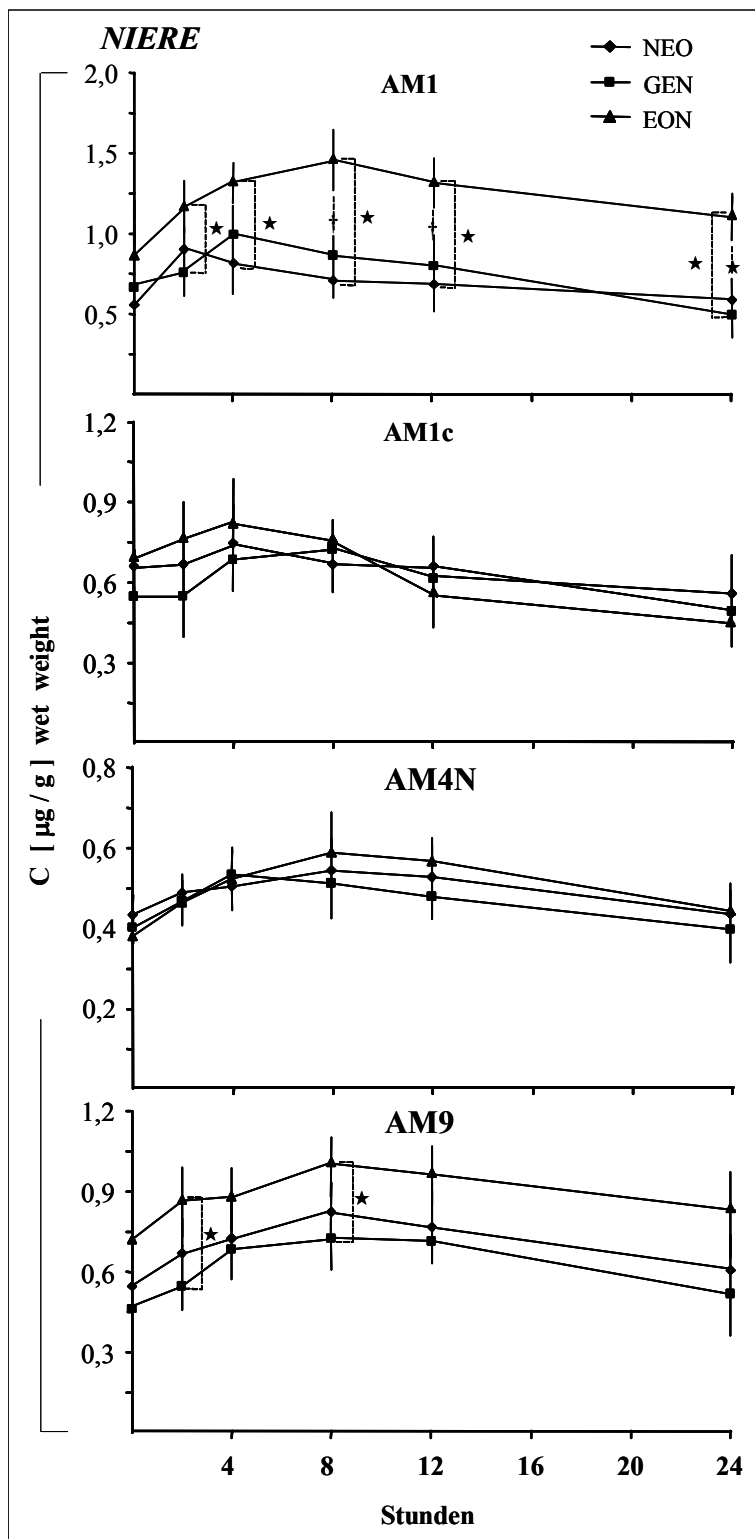
EON zeigte erhöhte AM1 Werte im Bereich von 8-12h, wobei die Talspiegel nicht differierten.

Jedoch beim zeitlichen Verlauf des AM4N waren beinahe über die komplette Zeitdauer die Spiegel der EON Gruppe erhöht. Dies deutet auf eine Resorptionsverzögerung hin, da AM4N vornehmlich durch die CYP 3A2 (Ratte) in der Dünndarmmucosa gebildet wird.



**Abb. 69** Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der CM im Vollblut (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , ★ p < 0.05)

► Konzentrations-Zeit Kurven der CM im Nierengewebe



AM1 war ähnlich wie im Blut bei der EON Gruppe signifikant erhöht. Die Konzentrationsverläufe des AM1c und überraschenderweise auch des AM4N unterschieden sich nicht signifikant zu keinem Zeitpunkt.

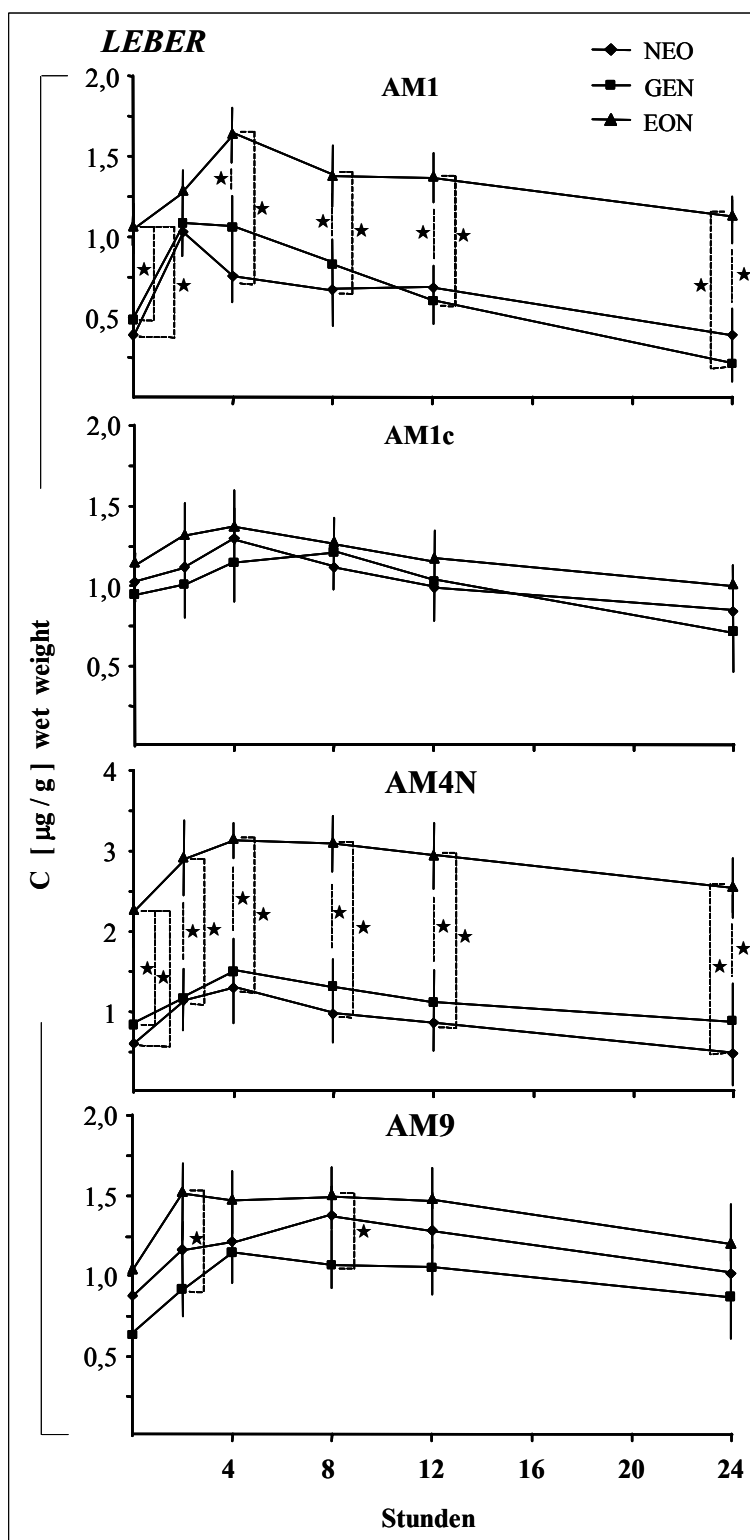
Dagegen war der Gehalt an AM9 der EON Tiere zu den Zeitpunkten 2 und 8h moderat gegenüber GEN erhöht. Ein Unterschied zu NEO war aufgrund der Streuung der Ergebnisse nicht nachweisbar.

**Abb. 70** Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der CM in der Niere (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , ★  $p < 0.05$ )



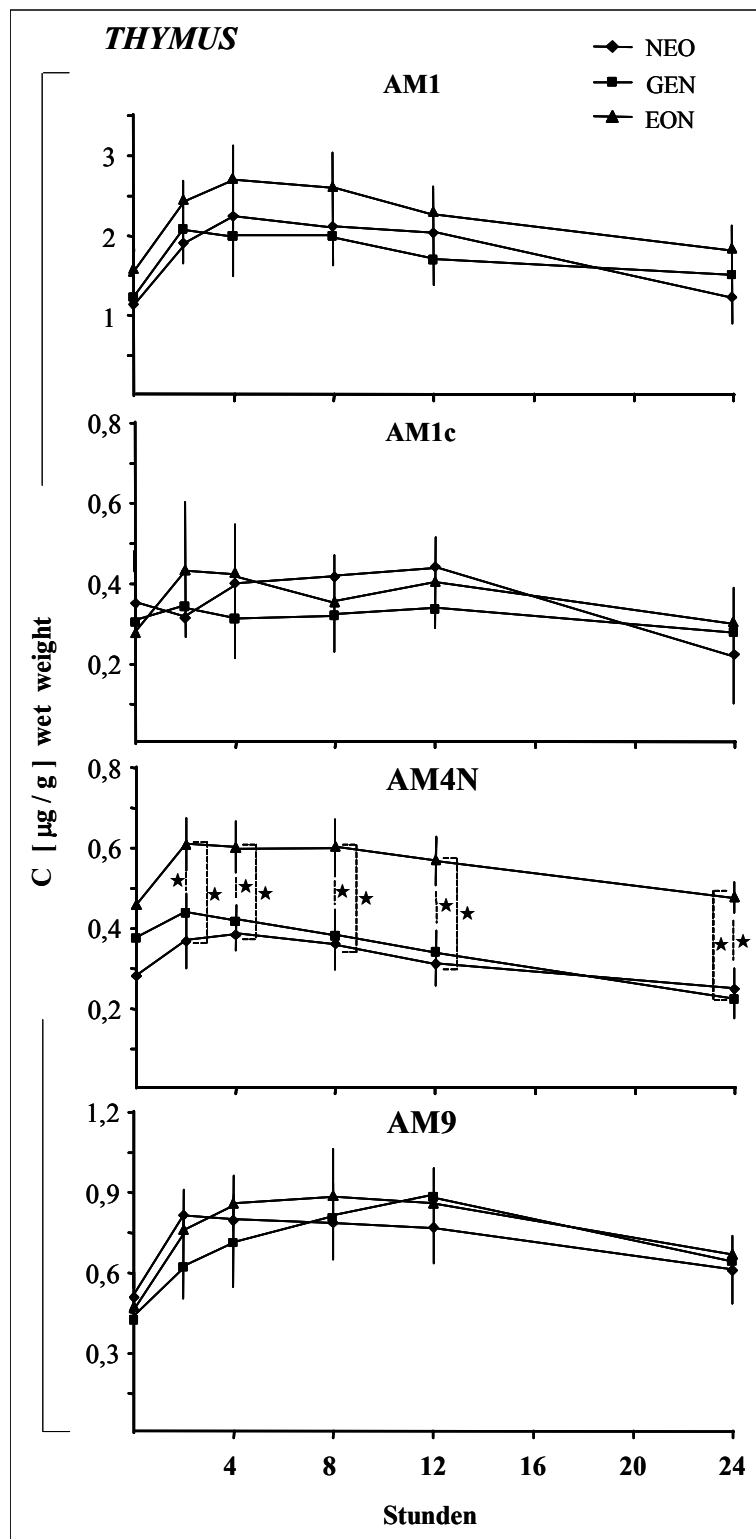
► Konzentrations-Zeit Kurven der CM im Lebergewebe

Die deutlichsten Unterschiede im Profil der CM traten in der Leber hervor. EON unterschied sich in den AM1 und AM4N Gehalten beträchtlich von NEO und GEN. Die Unterschiede betreffend AM9 waren nur gering ausgeprägt, während bei den AM1c Verläufen keinerlei Veränderungen messbar waren.



**Abb. 71** Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der CM in der Leber (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , ★ p < 0.05)

► Konzentrations-Zeit Kurven der CM im Thymusgewebe

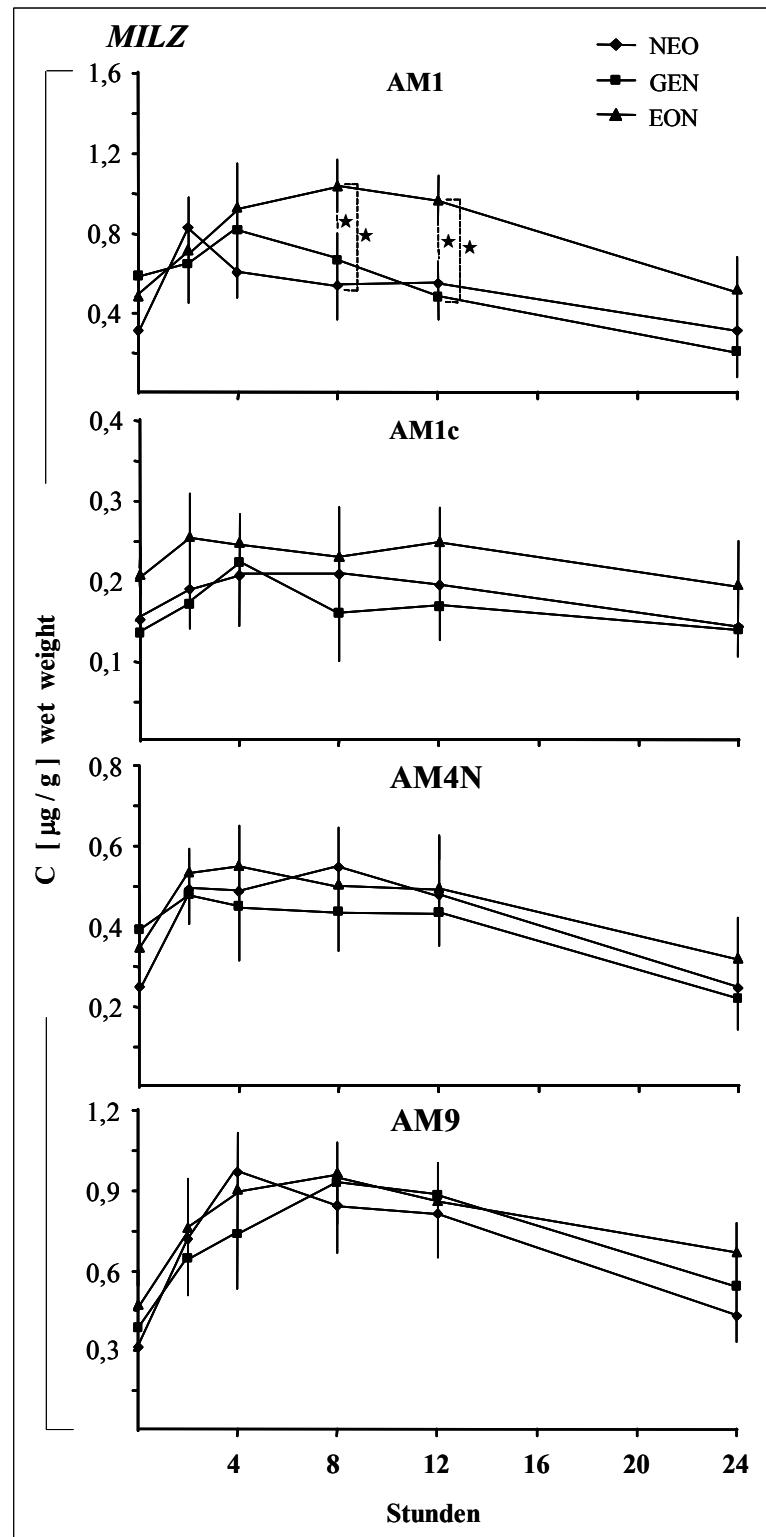


Interessanterweise zeigten sich im Thymusgewebe nur Unterschiede bezüglich der AM4N Spiegel der EON Gruppe.

**Abb. 72** Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der CM im Thymus (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , ★ p < 0.05)

► Konzentrations-Zeit Kurven der CM im Milzgewebe

Die Veränderungen in den CM Profilen im Milzgewebe waren minimal. Lediglich AM1 war im Intervall von 8-12h bei den EON Tieren signifikant höher.



**Abb. 73** Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der CM in der Milz (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , ★ p < 0.05)

### 6.3.3 Pharmakokinetische Parameter des CsA in nichttransplantierten Ratten:

		<i>Tmax [h]</i>		<i>Cmax [µg / ml oder g]</i>		<i>AUC [mg*h /l]</i>	
BLUT		NEO	EON	NEO	EON	NEO	EON
	CsA	2	8	2.7 (0.48)	1.61★ (0.32)	32.1 (4.32)	27.9★ (3.69)
	AM1	4	8	0.3 (0.05)	0.38 (0.07)	6.3 (0.93)	8.6 (2.22)
	AM4N	4	8	0.13 (0.04)	0.19 (0.03)	2.9 (0.39)	4.1★ (0.42)
	AM9	4	4	0.22 (0.04)	0.24 (0.03)	4.2 (0.61)	4.6 (0.7)
NIERE		NEO	EON	NEO	EON	NEO	EON
	CsA	2	4	11.9 (1.79)	7.9★ (1.25)	220.8 (29.5)	136.2★ (21.2)
	AM1	2	8	0.79 (0.1)	1.43★ (0.22)	20.5 (3.56)	54.3★ (11.2)
	AM4N	4	8	0.57 (0.09)	0.59 (0.11)	11.8 (1.87)	12.1 (2.14)
	AM9	8	8	0.81 (0.14)	1.12★ (0.18)	23.1 (3.11)	26.3 (4.23)
LEBER		NEO	EON	NEO	EON	NEO	EON
	CsA	2	8	24.2 (2.34)	13.1★ (0.86)	398.1 (35.2)	282.8★ (33.1)
	AM1	2	4	1.01 (0.17)	1.61★ (0.32)	22.1 (3.85)	61.2★ (10.2)
	AM4N	4	4	1.47 (0.16)	3.23★ (0.44)	23.5 (3.99)	51.3★ (8.2)
	AM9	8	4	1.23 (0.31)	1.51 (0.24)	32.2 (4.31)	34.7 (4.68)
THYMUS		NEO	EON	NEO	EON	NEO	EON
	CsA	2	4	14.1 (2.33)	7.6★ (1.5)	246.3 (33.6)	151.7★ (24.7)
	AM1	4	4	2.19 (0.78)	2.63 (0.55)	24.8 (4.23)	27.1 (5.21)
	AM4N	2	2	0.61 (0.12)	0.42★ (0.11)	15.9 (2.68)	21.8★ (1.97)
	AM9	2	8	0.75 (0.34)	0.89 (0.25)	21.4 (2.43)	23.9 (3.62)
MILZ		NEO	EON	NEO	EON	NEO	EON
	CsA	2	4	12.1 (1.97)	7.5★ (1.25)	236.8 (32.9)	145.3★ (19.2)
	AM1	4	8	0.83 (0.24)	1.02 (0.42)	17.8 (2.89)	19.9 (3.34)
	AM4N	8	4	0.53 (0.21)	0.55 (0.27)	12.5 (1.68)	13.71 (2.18)
	AM9	4	8	0.96 (0.28)	0.9 (0.18)	25.2 (3.53)	26.9 (4.33)

**Tab. 06** Pharmakokinetische Parameter (Tmax, Cmax, AUC, n = 6, x ± SEM, ★ vs NEO p < 0.05)

## 6.4 Pharmakokinetische Untersuchungen zur veränderten Bioverfügbarkeit des CsA nach Nierentransplantation in Ratten

Um weitere Erkenntnisse über die Zusammenhänge der veränderten Bioverfügbarkeit des CsA nach Organtransplantation zu sammeln, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt (s.a. 2.3 S.29):

- a) Bestimmung der Pharmakokinetik des CsA und der Metaboliten nach Nierentransplantation im Vollblut, Nieren- und Lebergewebe der Ratten nur bei NEORAL vs. EONLABS (TXEON bzw. TXEON)
- b) Bestimmung der Pharmakokinetik des CsA und der Metaboliten an niereninsuffizienten Ratten (nur NEORAL).
- c) Bestimmung der Pharmakokinetik des CsA und der Metaboliten unter IL-2 Gabe (nur NEORAL).

Um eine unnötige Redundanz zu vermeiden, werden im Folgenden nur die Ergebnisse im Vollblut der oben beschriebenen Tierversuche zur Pharmakokinetik des CsA und der Metaboliten dargestellt. In den untersuchten Geweben (Niere, Leber, Thymus, Milz) verbargen sich keine weiterführenden Erkenntnisse, denn die im Vollblut beschriebenen Unterschiede entsprachen im Wesentlichen den Ergebnissen in den Organen.

Für die Untersuchungen an niereninsuffizienten Ratten wurden nur Tiere verwendet, die nach 8-tägiger Behandlung mit Gentamicin (s. 4.2.4) einen Serum Creatinin Spiegel von über 4 mg/dl (SCrea > 4mg/dl) besaßen. Alle Versuch wurden im steady-state des CsA) nur Neoral) durchgeführt.

Verwendete Abkürzungen (s.a. 4.2.4)

<b>TXNEO, TXEON</b>	Allotransplantierte Versuchstiere mit 10 mg/kg*d CsA für 8 Tage		<b>NI</b>	Niereninsuffiziente Versuchstiergruppe, 100 mg/kg*d Gentamicin i.p. für 8 d, CsA 10 mg/kg*d
<b>NEO, EON</b>	Pharmakokinetik an Nichttransplantierten Versuchstieren (6.3)		<b>KNI</b>	Kontrollgruppe zu NI, 0,9% NaCl i.p. für 8 Tage, CsA 10 mg/kg*d
<b>IL</b>	Mit IL-2 vorbehandelte Versuchstiergruppe, IL-2 über osmotische Pumpe (s.4.2.4) für 8 Tage, CsA 10 mg/kg*d		<b>KIL</b>	Kontrollgruppe zu IL, 0,9% NaCl über osmotische Pumpe für 8 Tage, CsA 10 mg/kg*d

### 6.4.1 Pharmakokinetische Parameter des CsA und der Metaboliten im Vollblut

	<i>T max [h]</i>		<i>Cmax [µg/ml]</i>		<i>AUC [mg*h /l]</i>	
<b>TXNEO /TXEON</b>	TXNEO	TXEON	TXNEO	TXEON	TXNEO	TXEON
CsA	2	8	2.3 <sup>a</sup> (0.31)	1.02 <sup>b,c</sup> (0.27)	28.4 (5.08)	20.7 <sup>b</sup> (4.32)
AM1	4	4	0.43 (0.13)	0.32 (0.11)	6.8 (1.04)	7.1 (2.56)
AM4N	4	4	0.67 <sup>a</sup> (0.19)	0.93 <sup>b,c</sup> (0.13)	3.33 (0.41)	3.89 (0.59)
AM9	4	4	0.82 <sup>a</sup> (0.19)	1.08 <sup>b</sup> (0.35)	6.92 (1.21)	5.93 (0.92)
<b>KNI / NI</b>	KNI	NI	KNI	NI	KNI	NI
CsA	2	2	2.83 (0.55)	2.64 (0.42)	34.9 (5.62)	32.94 (5.81)
AM1	4	4	0.41 (0.11)	0.45 (0.08)	7.43 (1.21)	8.39 (2.59)
AM4N	4	4	0.08 (0.06)	0.13 (0.04)	2.56 (0.51)	2.89 (0.62)
AM9	4	4	0.36 (0.15)	0.31 (0.29)	4.8 (0.72)	5.23 (1.13)
<b>KIL / IL</b>	KIL	IL	KIL	IL	KIL	IL
CsA	2	4	2.73 (0.47)	1.84 (1.09)	31.7 (5.58)	19.2 (9.89)
AM1	4	4	0.21 (0.08)	0.34 (0.12)	5.24 (1.03)	6.34 (2.62)
AM4N	4	2	0.24 (0.07)	0.89 <sup>f</sup> (0.23)	3.21 (0.58)	6.18 <sup>f,g</sup> (0.82)
AM9	4	4	0.34 (0.08)	0.28 (0.11)	4.92 (0.59)	5.19 (1.03)

**Tab.07** Pharmakokinetische Parameter (Tmax, Cmax, AUC) im Vollblut (n = 5, x ± (SEM), Vergleich TXNEO zu NEO: **a** =p<0.05; TXEON zu EON: **b** =p<0.05; TXNEO zu TXEON: **c** =p<0.05; NI zu KNI: **d** =p<0.05; NI zu NEO: **e** =p<0.05; IL zu KIL: **f** =p<0.05, IL zu NEO: **g** = p<0.05)

✓ Zusammenfassung der Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen (6.3; 6.4):

#### Pharmakokinetik des CsA in nichttransplantierten Ratten (NEO, GEN und EON):

- Überraschenderweise wick das Absorptionsprofil des CsA aus der Eonlabs Formulierung bereits bei nichttransplantierten Ratten signifikant von Neoral und Gengraf ab, jedoch bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der AUC im Vollblut.
- Gravierender waren die Unterschiede im Nieren-, sowie auch im Thymus- und Milzgewebe. Dort war die AUC der EON Tiere signifikant niedriger als bei NEO und GEN.

- Auf der anderen Seite waren bei den nichttransplantierten Ratten erhöhte AUC Werte bei den Metaboliten AM4N im Blut, AM1 in der Niere, sowie AM1 und AM4N in der Leber erkennbar.
- Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen NEO und GEN, sowohl hinsichtlich der CsA Pharmakokinetik, noch bezüglich des Metabolitenmusters nachweisbar.

#### Pharmakokinetik des CsA in **nierentransplantierten** Ratten (TXNEO und TXEON):

- Die Allotransplantation führte zu erniedrigten C<sub>max</sub> Werten bei TXNEO (**a**) und TXEON (**b**) gegenüber den nichttransplantierten Ratten NEO bzw. EON.
- Zusätzlich war die C<sub>max</sub> Konzentration der TXEON Tiere niedriger als die der TXNEO Tiere (**c**). Die AUC des CsA war bei den TXEON Ratten niedriger als bei den EON Tieren, dies war bei der TXNEO Gruppe nicht der Fall.
- Die AUCs des CsA differierten nicht signifikant zwischen TXNEO und TXEON im Vollblut.
- Bezüglich der Metaboliten fanden sich zum einen höhere C<sub>max</sub> Werte des AM4N und AM9 im Vollblut der TXNEO (**a**) und TXEON (**b**) Tiere verglichen mit den NEO bzw. EON Gruppen. Das C<sub>max</sub> des AM4N der TXEON Gruppe war signifikant höher als bei den TXNEO Tieren (**c**). Die AUCs der CM unterschieden sich nicht signifikant im Vollblut der allotransplantierten Tiere.
- Das T<sub>max</sub> des CsA im Vollblut war viel später (8h) bei den Tieren der TXEON Gruppe.

#### Pharmakokinetik des CsA in **niereninsuffizienten** Ratten (NI nur Neoral):

- Das niereninsuffiziente Versuchstierkollektiv differierte in keiner Weise signifikant von den KNI bzw. NEO Gruppen hinsichtlich der Pharmakokinetik des CsA im Vollblut und den Organen. Es war lediglich eine Zunahme der SEM bei allen Messwerten erkennbar.
- Keine Unterschiede bestanden in den T<sub>max</sub> Zeitpunkten zwischen NI und KNI bzw. NEO.

#### Pharmakokinetik des CsA **unter IL-2 Gabe** in Ratten (IL nur Neoral):

- Die Pharmakokinetik des CsA und der CM war z.T. signifikant verändert unter kontinuierlicher IL-2 Applikation im Vollblut, sowie den Organen. Die C<sub>max</sub> und AUC Werte des CsA differierten z.T. erheblich, jedoch verhinderten starke Schwankungen in den Messwerten die Ausbildung signifikanter Unterschiede zu KIL bzw. NEO.
- Dagegen war unter IL-2 Gabe die AUC des Metaboliten AM4N im Vollblut signifikant höher als bei KIL und NEO.
- Zusätzlich bestanden Unterschiede zwischen den IL Tieren und KIL bzw. NEO hinsichtlich der T<sub>max</sub> Zeitpunkte des CsA (4h vs 2h) und des AM4N (2h vs 4h).
- Zusammenfassend betrachtet führte die kontinuierliche IL-2 Gabe zu starken Schwankungen in der Bioverfügbarkeit des CsA und zu einem späteren T<sub>max</sub>. Zugleich war die Konzentration des AM4N erhöht und das T<sub>max</sub> 2h früher als bei den KNI bzw. NEO Gruppen.

---

## 7 Diskussion

### 7.1 Austauschbarkeit von Original Medikamenten durch Generika bei Pharmaka mit kritischer Dosierung (NTI-Drugs: narrow therapeutic index drugs)

Es bestehen stark differierende Ansichten über den Grad der Sicherheit bei der Anwendung von Arzneistoffen mit kritischer Dosierung als Generika an kritischen Patienten. Zusätzlich herrscht Uneinigkeit zum einen über die notwendigen Maßnahmen zur Verbesserung der geltenden Zulassungsverfahren für Generika, zum andern über das Maß an Patientenüberwachung bei der Anwendung von Generika z.B. nach Organtransplantation (*Barr, 1999*).

Die Bioäquivalenz eines Generikums zu einem Originalprodukt bedeutet lediglich, dass dieses Arzneimittel in einem statistisch repräsentativen Durchschnittskollektiv von gesunden Probanden sicher in der Anwendung und wirksam ist. Die volle Austauschbarkeit von Generika des CsA bei organtransplantierten Patienten wurde jedoch im Rahmen der Zulassung nicht überprüft und kann folglich nur vermutet werden. Kommentare von Verfechtern der bestehenden Regelungen wie [„We don't see any dead bodies in the street“ (*Barr, 1999*)] sind sicherlich nicht angebracht, da die besprochenen Generika erst kürzlich auf den Markt gekommen sind und sich erst im Laufe mehrerer Jahre herausstellen wird, ob das Originalprodukt wirklich bedenkenlos ausgetauscht werden kann. Ein Kommentar des FDA Associate Commissioner for Health Affairs, *S. Nightingale*, zur Sicherheit der zugelassenen Generika, [“... any approved generic drug will be interchangeable under all approved indications and conditions of use.” (*Barr, 1999*)] zeigt recht deutlich mit welchen fadenscheinigen Argumenten in diesem Zusammenhang diskutiert wird. Es werden bei der Zulassung eines Generikums weder die Indikationen klinisch überprüft, noch besondere Anwendungsbedingungen z.B. in bekannten Malabsorberkollektiven. Nach dieser Definition wären Generika nur sicher bei der Anwendung an gesunden (männlichen) Probanden. Sollte sich herausstellen, dass bei der Anwendung von Generika z.B. als Immunsuppressiva zusätzliche Überwachungen oder ein aufwendigeres Drug Monitoring nötig wären, besäßen sie keinen wirtschaftlichen Vorteil mehr, besonders dann, wenn auf Grund einer reduzierten Bioverfügbarkeit eine höhere Dosierung erforderlich werden sollte.

### 7.2 Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik des CsA im Vergleich: Sandimmun® Neoral vs. Gengraf® und Eonlabs®

Die Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen zeigen signifikante Unterschiede in der Absorptionsrate ( $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ) zwischen den Produkten Eonlabs und Neoral, wobei Gengraf keine Unterschiede zu Neoral aufwies (6.3.1 S.109ff). Obwohl die beobachteten Unterschiede im Vollblut im Hinblick auf die AUC des CsA nicht signifikant waren, bestanden doch erhebliche Unterschiede in den Körpergeweben. Die Talspiegel des CsA im Vollblut waren jedoch bei allen Gruppen nicht unterschiedlich, was die bestehende Kritik bei der Verwendung der Talspiegel als Dosierungsparameter beim klinischen Drug Monitoring bestätigt (*Cole, 2000; Gaspari et al., 1997; Levy, 2001*). Wahrscheinlich war der schnellere Absorptionsprozess des Neoral bzw. Gengraf



der Grund für niedrigere AM4N Konzentrationen im Blut und in der Leber als bei den Tieren, welche die Eonlabs Formulierung bekamen (*Lindbergh-Freijis et al., 1994*). Dieser Zusammenhang wäre auch mit dem Ausmaß der dosisabhängigen Metabolisierung des CsA erklärbar, welches mit steigender Dosis abnimmt (6.1.2 S.68). Jedoch ist das kein stichhaltiger Beweis, da hierfür genauere Untersuchungen zur Enzymexpression bzw. Enzymaktivität der CYP3A Familie durchgeführt werden müssen.

### **7.3 Bioverfügbarkeit und Metabolismus des CsA im Vergleich: Sandimmun® Neoral vs. Gengraf® und Eonlabs® nach Nierentransplantation**

#### **7.3.1 Blut- und Gewebekonzentrationen des CsA und dessen Metaboliten**

6 Wochen nach Nierentransplantation besaßen alle Tiere signifikant niedrigere CsA Talspiegel im Vollblut als zu Beginn des Versuches (Abb.37 S.73). Die Talspiegel der mit Eonlabs behandelten transplantierten Ratten waren niedriger als bei den Tieren der Gruppen Neoral und Gengraf. Dieser Effekt war nach Isotransplantation nicht nachweisbar. Diese Unterschiede in den Talspiegeln des CsA konnten auch in den Organen Niere, Thymus und Milz bestätigt werden. In der Leber dagegen war eine gleichmäßige Erniedrigung feststellbar (Abb.41 S.78). Im Nierengewebe deutete die Verschiebung des Verhältnisses der CsA Konzentrationen im Nierenmark zum Nierencortex eine strukturelle Veränderung in den Nieren der Eonlabs-Tiere an (Abb. 39 S.75). Bei Betrachtung der histologischen Schnitte wurde u.a. deutlich, dass es sich hierbei um Einblutungen in das Nierenmark handelte (Abb.54 S.96).

Nach Allotransplantation war der Metabolismus des CsA verändert im Vergleich zu den Tieren, die nur die jeweiligen Medikamente bekamen, wobei wiederum die Tiere der Eonlabs Gruppe im Blut (Abb.38 S.74), im Thymus (Abb.42 S.80) und in der Leber (Abb.42 S.80) höhere AM4N Konzentrationen aufwiesen. Es traten organspezifische Unterschiede in den Metabolitenverteilungen auf, die entweder auf unterschiedlichen Penetrationseigenschaften der Metaboliten in verschiedene Gewebe beruhen oder durch gewebespezifische Metabolisierungsraten bedingt sind. Es wurde deutlich, dass nach Anwendung von Neoral und Gengraf niedrigere Konzentrationen an Metaboliten nachweisbar sind als nach Applikation der Eonlabs- Formulierung.

#### **7.3.2 Ausscheidung des CsA und dessen Metaboliten in den Urin**

Nach reiner Medikation (d.h. ohne OP) zeigen sich trotz vorhandener Unterschiede in den Blut- und Gewebespiegeln des CsA zwischen den drei untersuchten Pharmaka keine Differenzen in der CsA Ausscheidung in den Urin. (Abb.44 S.83). Diese Ergebnisse stimmen mit Befunden bezüglich der Exkretionsrate des CsA in den Urin überein, die etwa 6% der bioverfügbaren Dosis beträgt. Somit können Schwankungen bzw. Unterschiede in der Bioverfügbarkeit des CsA nicht oder nur sehr schlecht durch Messungen der CsA Ausscheidung in den Urin detektiert werden, da die Unterschiede zum einen minimal sind, zum anderen von Schwankungen der Messwerte überlagert werden.

## Metabolit AM4N

Die Ausscheidung des Metaboliten AM4N in den Urin hingegen zeigt ein sehr viel präziseres Abbild der Verhältnisse im Vollblut (Abb.46 S.85). Im Blut sind die AM4N Konzentrationen bei den Eonlabs Tieren signifikant höher als bei den Neoral und Gengraf Tieren. Eine zusätzliche Steigerung kann man nach Allotransplantation feststellen, bei gleichzeitig niedrigeren CsA Spiegeln im Blut und in den Organen. Diese Ergebnisse lassen sich auch im Urin bestätigen. Es gibt viele Vorschläge zur Messung bestimmter Metaboliten Konzentrationen im Urin, um Abstoßungsreaktionen bei Patienten frühzeitig zu erkennen. Favorisiert wird u.a. AM19 (*Kempkes-Koch et al., 2001*), der jedoch in sehr niedrigen Konzentrationen im Urin enthalten ist und im Vollblut in der Regel und Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze vorliegt. Die Aussagekraft derartiger Bestimmungen ist fraglich. In unserem Modell korreliert die AM4N Ausscheidung in den Urin sehr gut zum einen mit der geringeren Bioverfügbarkeit des CsA der Eonlabs Formulierung, zum anderen mit der schlechteren Nierenfunktion bzw. Histopathologie der Allotransplantate unter Eonlabs Gabe. Jedoch ist es sehr schwer hierzu allgemeine Richtlinien bzw. Grenzwerte abzuleiten, da die Metabolitenmuster beim Menschen einerseits genetischen Einflüssen unterliegen (CYP3A) zum anderen von bestehenden Vorerkrankungen und der begleitenden Medikation abhängen.

## Metabolit AM9

Eine überraschende Beobachtung konnte bei der Analyse der Ausscheidung des Metaboliten AM9 in den Urin gemacht werden (Abb.46 S.85). Die Ausscheidung nahm bei allen untersuchten Gruppen kontinuierlich und gleichmäßig innerhalb 6 Wochen zu. Da die Operationskontrolltiere (ITX+) und die Medikationskontrolltiere (NEO, GEN, EON) dieselben Veränderungen zeigen wie die allotransplantierten Tiere muss ein Effekt angenommen werden, der ausschließlich durch das CsA bedingt ist. Man muss in diesem Zusammenhang eine Induktion des Cytochrom P-450 Enzymsystems in Betracht ziehen, obwohl diese Vermutung nicht ganz schlüssig ist, da die anderen Metaboliten davon nicht betroffen sind. Es ist unwahrscheinlich, dass die Bildung dieses Metaboliten (Hydroxylierung an der AA 9) durch einen anderen Enzymkomplex erfolgt als z.B. die Hydroxylierung an AA 1. Weiterführende Untersuchungen auf molekularer Ebene zur Expression der CYP- Unterfamilien könnten hier Klarheit bringen. Diese Beobachtungen könnten auch durch Veränderungen der Filtrationseigenschaften in den Glomeruli bedingt sein. Aber auch die hierbei auftretenden Änderungen wären wahrscheinlich nicht identisch sowohl bei den Medikationstieren, als auch bei den allotransplantierten Tieren und den OP Kontrollgruppen.

Die Ausscheidung der Metaboliten AM1 und AM1c in den Urin (Abb.45 S.84) weisen keine erkennbaren Unterschiede auf.

### 7.3.3 Pharmakokinetik des CsA und der Metaboliten nach Nierentransplantation, unter Niereninsuffizienz und unter IL-2 Gabe

Die verzögerte Resorption des CsA aus der Eonlabs Formulierung verschlechtert sich nach Allotransplantation zusätzlich. Eine Verschlechterung des pharmakokinetischen Profils ist auch bei Neoral zu erkennen (Tab.07 S.118). Zwar sind hierbei die Veränderungen minimal, aber die Ratten zeigen ein signifikant erniedrigtes C<sub>max</sub>, bei gleichzeitig unveränderter AUC im Vollblut. Dagegen erhöhen sich bei beiden Gruppen die C<sub>max</sub> Konzentrationen der Metaboliten AM4N und AM9 im Blut. Untersuchungen an lebertransplantierten Patienten zeigen auch erhöhte Spiegel an Metaboliten des CsA, jedoch sind die gastrointestinalen Störungen nach einer Lebertransplantation gravierender als nach einer Nierentransplantation. Es scheint aber dennoch einen Einfluss auf die Resorptionsrate bzw. Metabolisierungsrate nach renaler Transplantation zu geben.

#### Niereninsuffizienz

Die untersuchten pharmakokinetischen Parameter der niereninsuffizienten Versuchstiere waren nicht unterschiedlich zu denen der Kontrolltieren (Tab.07 S.118). Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen an Ratten mit einer akuten Glycerol-induzierten Niereninsuffizienz (*Shibata et al. 1999*), die eine Erniedrigung der AUC des CsA erkennen ließen. Jedoch widersprechen die Ergebnisse von Shibata et al. vielen klinischen Studien an nierentransplantierten Patienten, die keinen Zusammenhang zwischen der Nierenfunktion (Serum Creatinin) und der Bioverfügbarkeit des CsA nachweisen konnten (*Shaw et al. 1987*). Des Weiteren ist eine Glycerol induzierte akute Niereninsuffizienz ein akut lebensbedrohlicher Zustand, der nicht die reale Situation einer reduzierten Nierenleistung bei nierentransplantierten Patienten widerspiegelt.

#### IL-2 Applikation

Der Grund für die Untersuchung der CsA Bioverfügbarkeit unter IL-2 Gabe waren die auffälligen IL-2 Konzentrationen im Serum und Nierengewebe nach Nierentransplantation trotz immunsuppressiver Therapie (Abb.51 S.93). Es wurde versucht diese Verhältnisse mit einer kontinuierlichen IL-2 Gabe zu imitieren und die Effekte auf den Metabolismus und die Bioverfügbarkeit des CsA zu studieren. Unter der kontinuierlichen Gabe von IL-2 waren die untersuchten pharmakokinetischen Parameter des CsA verändert (Tab.07 S.118), aber aufgrund einer starken Zunahme der Streuungen der Messwerte waren keine Signifikanzen darstellbar. Diese Befunde stehen in Einklang zu klinischen Studien, die ebenfalls stärkere inter- und intraindividuellen Schwankungen bei organtransplantierten Patienten als bei gesunden Probanden berichten (*Barr et al., 1999*). Eine Ausnahme bildete die AUC des AM4N, die signifikant erhöht war im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine reduzierte Bioverfügbarkeit und erhöhte Metabolisierungsrate finden sich z.B. auch bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen. Eine Untersuchung der Wirksamkeit des CsA bei Verbrennungen II. Grades an Ratten hatte ebenfalls eine reduzierte Bioverfügbarkeit des CsA zur Folge (*Gurbuz et al., 1997*). Eine Verbrennung ruft eine starke generalisierte Immunreaktion hervor, die auch andere Organe, z.B. den Darm, durch Infiltration mit Neutrophilen in

Mitleidenschaft ziehen kann. Leider wurde in dieser Arbeit nicht versucht die zugrunde liegenden Mechanismen zu durchleuchten (z.B. Beteiligung von Cytokinen). Jedenfalls scheint die IL-2 Gabe die Pharmakokinetik bzw. Bioverfügbarkeit des CsA zu beeinflussen, jedoch bleiben die auslösenden Mechanismen unbekannt.

## **7.4 Nephrotoxizität des CsA und Änderung der Nierenfunktionsparameter nach Nierentransplantation**

### **7.4.1 Änderung des Serum Creatinins und der 8-Isoprostan Ausscheidung in den Urin**

Die Analysen der Serum Creatininwerte (SCrea) und der 8-IP Bildung bei den verschiedenen Tierversuchsgruppen erlauben einen differenzierten Blick auf die ursächlichen Ereignisse der Reduzierung der Nierenleistung (Abb.47 S.78; Abb.49 S.89). Die erhaltenen Daten lassen den Schluss zu, dass die Bestimmung der Veränderung der 8-IP Exkretion in den Urin ein viel sensitiveres Indikatorsystem darstellt als die Messung des SCrea. Die alleinige Medikation veränderte das SCrea über 6 Wochen bei keinem der Versuchstiere, auch waren keine Veränderungen zwischen den einzelnen Pharmaka erkennbar. Die 8-IP Bildung hingegen weist nach 3 und 6 Wochen signifikante Erhöhungen bei der Applikation von Neoral und Gengraf, nicht dagegen bei Eonlabs, auf. Erklärbar ist dies durch die geringere Bioverfügbarkeit des CsA bei Verwendung der Eonlabs Formulierung. Nach Allotransplantation jedoch stieg das SCrea, sowie die ausgeschiedene 8-IP Menge im Urin bei Verwendung der Eonlabs Formulierung stärker an als bei den anderen Medikamenten.

### **7.4.2 Erhöhung des systolischen Blutdrucks**

Einer Erhöhung des systolischen Blutdrucks kann man nach Allotransplantation nach 1 und 3 Wochen bei allen Versuchstieren feststellen, der jedoch, außer bei den Eonlabs Tieren, nach 6 Wochen signifikant abfiel (Abb.50 S.91). Die Blutdruckwerte der allotransplantierten Ratten lagen aber immer noch signifikant über den Werten der Medikationskontrolltiere. Beim Vergleich der Blutdruckdaten mit den Ergebnissen der mRNA Genexpression des Renins bzw. der PRA wird deutlich, dass der erhöhte systolische Blutdruck nach 6 Wochen nicht durch eine gesteigerte Plasminogenaktivität bzw. Genexpression bedingt sein kann, da die mRNA Abundanz des Renins anscheinend aufgrund des erhöhten Blutdrucks erniedrigt wurde (*Rettig et al., 1994*). Als potentieller Verursacher der Blutdrucksteigerung könnte das Endothelin-1 (ET-1) verantwortlich gemacht werden, da dessen mRNA Genexpression in der Niere signifikant erhöht war. Jedoch zeigt die mRNA Abundanz des ET<sub>B</sub> Rezeptors als Antwort auf die gesteigerte ET-1 Expression eine Reduzierung. In nierentransplantierten Patienten kann häufig eine leichte Stimulierung der Renin mRNA Genexpression beobachtet werden, die

hauptsächlich auf eine Mangelperfusion der noch vorhandenen nativen Nieren zurückgeht (*Farge et al., 1998*).

### **7.4.3 Änderung der mRNA Genexpression in der Niere unter Neoral und Eonlabs Therapie**

Obwohl die Gewebekonzentrationen des CsA, sowie die CsA Spiegel im Vollblut unter Eonlabs Medikation signifikant niedriger waren als bei der Applikation des Neoral, fanden sich keine Differenzen in den mRNA Abundanzen in der Niere zwischen den beiden Pharmaka bezüglich des Renins, der COX-1 und -2, des Kollagens-1, des Fibrinogens, der ET-1 und -3, sowie deren Rezeptoren (Abb.57-64 S.99-105). Dieser Befund könnte durch die pharmakologische Aktivität der CsA Metaboliten bedingt sein, die unter Eonlabs Gabe in höheren Konzentrationen vorliegen als unter Neoral Applikation. Da es bisher keine Daten zu differenzierten pharmakodynamischen Wirkungen des CsA und dessen Metaboliten gibt, liegt der Schluss nahe, dass die Gesamtwirkung des CsA auf die mRNA Genexpression auch auf den additiven bzw. synergistischen Wirkungen der Metaboliten beruht. Die immunsuppressive Wirkung scheint dagegen allein durch das CsA bedingt zu sein, da unter Eonlabs Therapie der Grad an Abstoßungsvorgängen höher ist bzw. die Nierenfunktion nach Allotransplantation deutlich eingeschränkt ist.

Der einzige Unterschied zwischen Neoral und Eonlabs war in der mRNA Genexpression des Kollagens-3 feststellbar (Abb.64 S.105). Sie war stärker ausgeprägt unter Gabe des Neoral und könnte folglich durch die höheren Gewebespiegel des CsA verursacht worden sein.

Die Genexpression der COX-2 ist unter CsA Gabe niedriger als bei den Kontrolltieren (Abb.58 S.100) und wird nach Allotransplantation noch weiter erniedrigt. Eine Erniedrigung der COX-2 Expression unter CsA Gabe kann folgendermaßen erklärt werden: Eine gesteigerte ET-1 Synthese führt über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT2 zu einer Erhöhung der COX-2 Genexpression. Die Aktivierung des NFAT2 und die Bildung des NFAT2-DNA-Adduktes kann durch CsA blockiert werden (*Sagimoto et al., 2001*). Warum jedoch die Transplantation der Niere zu einem weiteren Absinken in der COX-2 mRNA Abundanz führt ist unklar.

## **7.5 Histologische Befunde nach Applikation von CsA und nach Nierentransplantation**

Grundsätzlich kann man die histologische Beurteilung von Schäden durch das CsA auf das Nierengewebe und die Histopathologie der Abstoßungsprozesse in der Niere gut voneinander trennen. Die Problematik in der Praxis ist jedoch dadurch bedingt, dass sich die Schädigungen von Nierenstrukturen durch das CsA und durch die Abstoßungsvorgänge überlagern bzw. sich gegenseitig verstärken können. Dies betrifft hauptsächlich die Schäden an den Nierenglomeruli und an interstitiellen Strukturen, wie den Tubuli. Die histologischen Schäden an den Gefäßen (Arterien) der Niere sind jedoch

in der Regel eindeutig definierbar. Man spricht von der Mikroangiopathie (Arteriolen) durch das CsA und von einer Arteriopathie (Arterien) während einer Abstossungsepisode. Schwieriger ist die Unterscheidung der Schäden an den Gefäßen der Glomeruli (*Mihatsch et al., 1995*). In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Problem durch Gegenüberstellung verschiedener Kontrollgruppen und Differenzierung der einzelnen Schäden umgangen (Abb.54-56 S.96-98). Dies ist jedoch bei einer klinischen histologischen Diagnose nicht möglich.

Histologisch waren nach alleiniger Medikation über 6 Wochen keine pathologischen Veränderungen in den Nieren der Versuchstiere erkennbar. Zwar waren die 8-IP Ausscheidungen leicht erhöht, das SCrea war dagegen nicht unterschiedlich. Die gravierendsten Auswirkungen auf die Nierenhistologie waren bei den unterdosierten allotransplantierten Tieren erkennbar. Auch waren deutliche Unterschiede zwischen den allotransplantierten Tieren unter Neoral und Eonlabs Therapie erkennbar. Die Eonlabs Formulierung führte sowohl in transplantierten als auch in nichttransplantierten Tieren zu erhöhten Metaboliten Spiegeln und zu erniedrigten CsA Konzentrationen. Es konnte jedoch in der Histologie der nichttransplantierten Tiere kein Unterschied zwischen Neoral und Eonlabs gefunden werden. Somit scheinen die Metaboliten auf die „gesunde“ Niere keine negativen Einflüsse zu besitzen. Die pathologischen Befunde in der Histologie der Nieren der TXEON Ratten können daher auf die Folgen der niedrigeren CsA Konzentrationen und die damit verbundene unzureichende Immunsuppression zurückgeführt werden. Obwohl die Nieren der isotransplantierten Tiere keine histologischen Schäden aufweisen, so können nach Allotransplantation doch alle möglichen Schäden (warme und kalte Ischämiezeit, Reperfusionsschaden bzw. CsA und CM Toxizität) das histologische Bild bestimmen.

---

## **8 Zusammenfassung**

### **8.1 Untersuchungen zur Bioäquivalenz der Pharmaka Sandimmun® Neoral, Gengraf® und Cyclosporine A Eonlabs®**

Die geltenden Zulassungsvoraussetzungen für Generika des CsA scheinen die zweifellos vorhandenen Unterschiede in den galenischen Zubereitungen nicht vollständig zu erfassen. In dieser Arbeit konnten signifikante Unterschiede in der Bioverfügbarkeit, im Metabolismus und in der Effektivität der Immunsuppression von bioäquivalenten Arzneimitteln nach Nierentransplantation in Ratten dargestellt werden. Das Produkt der Fa. Eonlabs scheint deutlich weniger effizient zu sein als die CsA Arzneimittel der Firmen Novartis und Abbott. Zwar wurden die Originalprodukte durch Auflösen der Kapseln verändert, jedoch galten für alle drei Produkte dieselben Ausgangsbedingungen. Des Weiteren können die gefundenen Unterschiede in einem genetisch sehr homogenen Rattenkollektiv in der klinischen Situation bei organtransplantierten Patienten oder bei Probanden durch die starke Variabilität in der Bioverfügbarkeit des CsA maskiert werden. Man wird erst im Laufe mehrerer Jahre und nach mehrfachem Austausch der immunsuppressiven Medikamente die möglichen Folgen auf die Transplantatüberlebensrate feststellen können.

Darüber hinaus ist das Profil der CsA Metaboliten z.B. im Vollblut der Ratten abhängig von der Galenik des verwendeten Pharmakons.

### **8.2 Auswirkungen des CsA auf verschiedene mRNA Genexpressionen in der Niere**

Die vorhandenen Unterschiede in den Blut- und Gewebekonzentrationen des CsA nach Applikation der drei Pharmaka führen zu keinen Differenzen in der mRNA Genexpression des Renins, der COX-1 und -2, der Endotheline-1 und -3, sowie deren Rezeptoren und des Kollagens-1 und Fibrinogens. Somit scheinen die höheren Metaboliten Werte nach Eonlabs Gabe eine additive oder synergistische Wirkung bezüglich der mRNA Abundanz in der Niere zu besitzen. Die immunsuppressive Wirkung dagegen wird alleine durch die Muttersubstanz bestimmt.

Der einzige gefundene Unterschied in der Genexpression zwischen Neoral und Eonlabs war die höhere Genexpression des Kollagens-3 im Nierengewebe nach Gabe des Neoral. Folglich könnte diese Erhöhung stärker von der Konzentration der Muttersubstanz abhängen als von vorhandenen Metaboliten des CsA.

### **8.3 Veränderung des Metabolismus des CsA nach Nierentransplantation**

Der Metabolismus des CsA ist nach Allotransplantation der Niere in Ratten intensiver als bei nichttransplantierten Tieren. Dies zeigt sich hauptsächlich in der Konzentration des vornehmlich in der Dünndarmmucosa gebildeten Metaboliten AM4N. Die Ausscheidung des AM4N in den Urin spiegelt die erhöhten Gehalte im Vollblut und in den Körpergeweben wider, wodurch die Bestimmung des AM4N im Urin eine

empfehlenswerte Möglichkeit zur Ermittlung einer gestörten CsA Resorption nach Transplantation der Niere wäre.

Die Bioverfügbarkeit des CsA unterliegt nach Nierentransplantation größeren Schwankungen, wobei Versuche zur Ermittlung der zugrunde liegenden Mechanismen auf eine Beteiligung von Cytokinen, wie dem IL-2, hindeuten. Es konnte kein Einfluss der Nierenfunktion auf die Bioverfügbarkeit des CsA nachgewiesen werden. Der Anfangs beschriebene Circulus vitiosus (2.3 S.29) scheint sich zu bestätigen, da eine unzureichende Immunsuppression zu erhöhten IL-2 Spiegeln führt, welche wiederum die Resorption des CsA erniedrigen können. Dieser Zusammenhang steht auch im Einklang mit der Tatsache, dass der Beginn der CsA Therapie bei bereits manifesten Abstoßungsvorgängen keinen großen Nutzen mehr hat. Weiterführende Untersuchungen zur gezielten Beeinflussung der CYP3A Genexpression im Dünndarm und in der Leber durch verschiedene Cytokine wird der Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Eine neue Erkenntnis sind auch die stark unterschiedlichen Gewebekonzentrationen der Metaboliten des CsA in den untersuchten Organen. Es ist einleuchtend, dass die Metaboliten in der Leber, neben dem Dünndarm der Hauptmetabolisierungsort des CsA, in höheren Konzentrationen vorliegen als in anderen Organen. Die unterschiedlichen Gehalte im Thymus, in der Milz und in den Nieren könnten auf unterschiedlichen Gewebegängigkeiten der Metaboliten beruhen oder durch gewebespezifischen Stoffwechsel bedingt sein.

#### **8.4 Histopathologie der Nieren**

Durch Begutachtung der Nierenschnitte der einzelnen Tierversuchsgruppen waren detaillierte Aussagen bezüglich der Nephrotoxizität des CsA und der morphologischen Veränderungen aufgrund von Abstoßungsprozessen möglich. Die Anwendung des CsA alleine verursachte keine erkennbaren Schäden an den Nieren der Ratten. Jedoch waren die Befunde nach Transplantation und Gabe von Eonlabs negativer als unter Neoral und Gengraf Therapie. Starke pathologische Veränderungen fanden sich in den Nierenschnitten der unterdosierten Vergleichsgruppe.



---

## 9 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen des Zulassungsverfahrens von Generika des Neoral muss die Einbeziehung von Risikogruppen, z.B. organtransplantierte Patienten, ältere Patienten (über 60 Jahre), bekannte Malabsorberkollektive wie Kinder, Menschen schwarzer Hautfarbe und Asiaten, in klinische Studien gefordert werden. Nur so können im Vorfeld eventuelle Unterschiede ganzheitlich erfasst werden, denn bei Arzneistoffen mit geringer therapeutischer Breite wie dem CsA ist die Bioäquivalenz bei gesunden Probanden nicht gleichbedeutend mit einer klinischen Äquivalenz bei Patienten und anderen Risikogruppen. Wie auch in der einschlägigen Literatur vorgeschlagen wird, sollte bei der Anwendung von generischen CsA Pharmaka bei nierentransplantierten Patienten eine umfassendere Kontrolle der CsA Spiegel durchgeführt werden. Der wirtschaftliche Vorteil der Anwendung von Generika des Neoral wäre nicht mehr gegeben, würden ausgedehnte klinische Studien an Patienten durchgeführt werden und müssten intensivere Überwachungen über einen längeren Zeitraum bei der Anwendung an Patienten angewendet werden.

Ein weiterer Punkt, der bei der Zulassung Aufschluss über das Ausmaß der Resorption geben könnte, wäre die Ermittlung der Hauptmetaboliten des CsA. In diesem Zusammenhang sollte auch gefordert werden, dass die Analytik bei Probanden- bzw. Patientenstudien ausschließlich mit der HPLC durchgeführt wird. Die Verwendung von verschiedenen Radioimmunoassays (RIA) birgt immer das Risiko der Kreuzreaktion mit den Metaboliten bei der Bestimmung der CsA Konzentrationen. Die Vergleichbarkeit der Studienergebnisse bei Anwendung verschiedener analytischer Methoden bzw. verschiedener RIAs ist zudem fraglich. Die Verwendung von „Durchschnitts-AUCs“ aus den arithmetischen Mittelwerten der Blutkonzentrationen der einzelnen Probanden im Rahmen der Zulassung von Generika ist ein weiterer Kritikpunkt, da durch diese Methode die intraindividuellen Schwankungen der Messwerte nur unzureichend berücksichtigt werden. Deswegen muss die Angabe der individuellen AUCs und die damit verbundenen individuellen Schwankungen der Probandendaten gefordert werden (*Haug III et al., 2000*).

Um die Mechanismen der Beeinflussung des Metabolismus des CsA nach Organtransplantation bzw. der CYP3A Enzyminduktion besser verstehen zu können sind weitere gezielte Experimente mit verschiedenen Cytokinen notwendig. In der Zukunft könnte das Wissen um diese Zusammenhänge ein gezieltes pharmakologisches Eingreifen zur Verbesserung der CsA Bioverfügbarkeit ermöglichen.

Bei der histologischen Begutachtung von Biopsie-Proben von Nieren, deren Transplantation mehr als 10 Jahre zurückliegt, kann man auch trotz konstanter CsA Spiegel starke morphologische Veränderungen feststellen (*Libby et al., 2001; Waller et al., 2001*). Diese chronischen Abstoßungsprozesse können mit den derzeit verfügbaren Arzneistoffen nicht behandelt werden. Neue Pharmaka, wie z.B. das Makrolidderivat Rapamycin, oder neue molekularbiologische Erkenntnisse über die ablaufenden Vorgänge in der Niere (z.B. Steigerung der TGF $\beta$  Expression) führen vielleicht schon in absehbarer Zukunft zu effektiveren immunsuppressiven Langzeittherapien.

---

## 10 Literatur

- Abella I. 1996.** Pharmacoeconomics of Neoral, a new formulation of cyclosporine, in renal transplantation. *Transplant.Proc.* **28**: 3131-3134.
- Abendroth D, Buchholz B, Land W, May G, Wiesel M, Farber L, Korn A, Maibucher A. 1997.** Comparison of efficacy, safety, and tolerability of Neoral vs Sandimmun in de novo renal transplant patients over 24 months' treatment. *Transplant.Proc.* **29**: 275-276.
- Abdelnoor AM. 2001.** Soluble HLA Class I molecules as immunoregulators in Transplantation *Transplant.Proceed.* **33**: 2850-51.
- Akagi H, Reynolds A, Hjelm M. 1991.** Cyclosporin A and its metabolites, distribution in blood and tissues. *J.Int.Med.Res.* **19**: 1-18.
- Amante AJ, Meier-Kriesche HU, Schoenberg L, Kahan BD. 1997.** A pharmacokinetic comparison of the corn oil versus microemulsion gelcap formulation of cyclosporin used de novo after renal transplantation. *Transpl.Int.* **10**: 217-222.
- Arumugam R, Soriano HE, Scheimann AO, Reid BS, Gopalakrishna GS, Barakat O, Ozaki CF, Wood RP. 1998.** Microemulsion cyclosporine (Neoral) immunosuppression for orthotopic liver transplantation in children reduces hospital stay. *Transplant.Proc.* **30**: 1848-1849.
- Arvind C, Vathsala A, Woo KT. 2000.** Conversion from once-daily Sandimmune cyclosporine to once-daily Neoral in renal transplant patients. *Transplant.Proc.* **32**: 1681-1682.
- Aspeslet LJ, LeGatt DF, Murphy G, Yatscoff RW. 1997.** Effect of assay methodology on pharmacokinetic differences between cyclosporine Neoral and Sandimmune formulations. *Clin.Chem.* **43**: 104-108.
- Augustine JA, Zemaitis MA. 1986.** The effects of cyclosporin A (CsA) on hepatic microsomal drug metabolism in the rat. *Drug Metab.Dispos.* **14**: 73-78.
- Augustine JA, Zemaitis MA. 1989.** A comparison of the effects of cyclosporine (CsA) on hepatic microsomal drug metabolism in three different strains of rat. *Gen.Pharmacol.* **20**: 137-141.
- Awad JA, Morrow JD, Takahashi K, Roberts LJ. 1993.** Identification of non-cyclooxygenase-derived prostanoid (F2- isoprostane) metabolites in human urine and plasma. *J.Biol.Chem.* **268**: 4161-4169.
- Babarykin D, Amerika D, Adamsone I, Valinietse M, Rosental R. 1996.** Transfer of patients with kidney grafts to Sandimmun Neoral normalizes the calcium level in erythrocytes. *Transplant.Proc.* **28**: 3137.
- Back DJ, Tjia JF. 1991.** Comparative effects of the antimycotic drugs ketoconazole, fluconazole, itraconazole and terbinafine on the metabolism of cyclosporin by human liver microsomes. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **32**: 624-626.
- Bagnis C, Deray G, Dubois M, Pirotzky E, Jacquiaud C, Baghos W, Aupetit B, Braquet P, Jacobs C. 1996.** Prevention of cyclosporin nephrotoxicity with a platelet-activating factor (PAF) antagonist. *Nephrol.Dial.Transplant.* **11**: 507-513.
- Bagnis C, Deray G, Dubois M, Adabra Y, Jacquiaud C, Jaudon MC, Jacobs C. 1997.** Comparative acute nephrotoxicity of FK-506 and cyclosporin in an isolated in situ autoperfused rat kidney model. *Am.J.Nephrol.* **17**: 17-24.
- Bagwe. 2001.** Improved Drug Delivery using Microemulsions: Rationale, Recent Progress and New Horizons. *Cri.Rev.Ther.Drug.Car.Sys.* **18**: 77-140.
- Bakr MA, Refaie A, Mekresh M, Ihab MH, Sobh M, Ghoneim MA. 1997.** Cyclosporine Neoral in renal transplant recipients: impact on hepatic dysfunction. *Transplant.Proc.* **29**: 2939-2940.

- Baldari CT, Heguy A, Telford JL. 1993.** Calcium-dependent cyclosporin A-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by p56lck. *J.Biol.Chem.* **268**: 8406-8409.
- Banfi G, Montagnino G. 1986.** Renal biopsy in ciclosporin-treated kidney transplant patients. *Contrib.Nephrol.* **51**: 162-164.
- Banfi G, Imbasciati E, Fogazzi GB, Tarantino A. 1987.** Renal lesions in ciclosporin A-treated kidney transplant patients. *Appl.Pathol.* **5**: 95-100.
- Barany P, Stenvinkel P, Ottosson-Seeberger A, Alvestrand A, Morrow J, Roberts JJ, Salahudeen AK. 2001.** Effect of 6 weeks of vitamin E administration on renal haemodynamic alterations following a single dose of neoral in healthy volunteers. *Nephrol.Dial.Transplant.* **16**: 580-584.
- Barbari A, Stephan A, Kamel G, Kilany H, Masri MA. 1997.** Experience with new cyclosporine formulations: Consupren and Neoral in renal transplant patients. *Transplant.Proc.* **29**: 2941-2944.
- Barone G, Bunke CM, Choc MG, Jr., Hricik DE, Jin JH, Klein JB, Marsh CL, Min DI, Pescovitz MD, Pollak R, Pruett TL, Stinson JB, Thompson JS, Vasquez E, Waid T, Wombolt DG, Wong RL. 1996.** The safety and tolerability of cyclosporine emulsion versus cyclosporine in a randomized, double-blind comparison in primary renal allograft recipients. The Neoral Study Group. *Transplantation* **61**: 968-970.
- Barone G, Chang CT, Choc MG, Jr., Klein JB, Marsh CL, Meligeni JA, Min DI, Pescovitz MD, Pollak R, Pruett TL, Stinson JB, Thompson JS, Vasquez E, Waid T, Wombolt DG, Wong RL. 1996.** The pharmacokinetics of a microemulsion formulation of cyclosporine in primary renal allograft recipients. The Neoral Study Group. *Transplantation* **61**: 875-880.
- Barr WH. 1999.** Scientific and Professional Concerns Regarding Product Interchange and Subsequent Monitoring of Cyclosporine and Other Critical Dose Drugs. *Transplant.Proceed.* **31**: 1645-48.
- Bartucci M, Koshla B, Fleming-Brooks S, Weigel K, Donley V, Schulak JA, Knauss TC, Hricik DE. 1997.** Renal function following conversion from Sandimmune to Neoral in stable renal transplant recipients. *J.Transpl.Coord.* **7**: 78-81.
- Battle DC, Gutterman C, Keilani T, Peces R, LaPointe M. 1990.** Effect of cyclosporin A on renal function and kidney growth in the uninephrectomized rat. *Kidney Int.* **37**: 21-28.
- Beals CR, Clipstone NA, Ho SN, Crabtree GR. 1997.** Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin- sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev.* **11**: 824-834.
- Becker BN, Odorico JS et al. 2001.** Simultaneous pancreas-kidney and pancreas Transplantation. *J.Am.Soc.Nephrol.* **12**: 2517-27.
- Beleva B. 1990.** [Arterial hypertension following kidney transplantation in patients on conventional immunosuppressive therapy and in those on cyclosporin A]. *Khirurgiia (Sofiia)* **43**: 43-47.
- Belitsky P, Levy GA, Johnston A. 2000.** Neoral absorption profiling: an evolution in effectiveness. *Transplant.Proc.* **32**: 45S-52S.
- Belitsky P. 2000.** Neoral use in the renal transplant recipient. *Transplant.Proc.* **32**: 10S-19S.
- Bell A, Wernli B, Franklin RM. 1994.** Roles of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and calcineurin in the mechanisms of antimalarial action of cyclosporin A, FK506, and rapamycin. *Biochem.Pharmacol.* **48**: 495-503.
- Belli LS, Slim OA, De Carlis L, Rondinara GF, Alberti A, Zoppi F, Bellati G, Fesce E, Airolidi A, Colombo D, . 1994.** Neoral in liver transplant patients: pharmacokinetic study and clinical implications. *Transplant.Proc.* **26**: 2981-2982.
- Bemer V, Truffa-Bachi P. 1996.** T cell activation by concanavalin A in the presence of cyclosporin A: immunosuppressor withdrawal induces NFATp translocation and interleukin- 2 gene transcription. *Eur.J.Immunol.* **26**: 1481-1488.

- Benigni A, Chiabrando C, Piccinelli A, Perico N, Gavinelli M, Furci L, Patino O, Abbate M, Bertani T, Remuzzi G. 1988.** Increased urinary excretion of thromboxane B2 and 2,3-dinor-TxB2 in cyclosporin A nephrotoxicity. *Kidney Int.* **34**: 164-174.
- Benigni A, Perico N, Remuzzi G. 1989.** Abnormalities of arachidonate metabolism in experimental cyclosporin nephrotoxicity. *Am.J.Nephrol.* **9 Suppl 1** : 72-77.
- Benet LZ et al. 1999.** Relevance of Pharmacokinetics in NTI Drugs. *CurrTransplant.Proceed.* **31**: 1642-44.
- Bennett PC, Zhao W, Lawen A, Ng KT. 1996.** Cyclosporin A, an inhibitor of calcineurin, impairs memory formation in day-old chicks. *Brain Res.* **730**: 107-117.
- Bertault-Peres P, Bonfils C, Fabre G, Just S, Cano JP, Maurel P. 1987.** Metabolism of cyclosporin A. II. Implication of the macrolide antibiotic inducible cytochrome P-450 3c from rabbit liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* **15**: 391-398.
- Bickel M, Tsuda H, Amstad P, Evequoz V, Mergenhagen SE, Wahl SM, Pluznik DH. 1987.** Differential regulation of colony-stimulating factors and interleukin 2 production by cyclosporin A. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**: 3274-3277.
- Bilbao I, Parrilla P, Rimola A, Figueras J, Fabrega E, Gomez M, De Vicente E, Margarit C. 1998.** Improvement in correlation between oral dose of cyclosporine and cyclosporinemia after substitution of conventional cyclosporine by Neoral cyclosporine in 296 liver transplant patients. *Transplant.Proc.* **30**: 1833-1837.
- Bistrup C, Nielsen FT, Jeppesen UE, Dieperink H. 2001.** Effect of grapefruit juice on Sandimmun Neoral absorption among stable renal allograft recipients. *Nephrol.Dial.Transplant.* **16**: 373-377.
- Bleck JS, Schlitt HJ, Christians U, Thiesemann C, Strohmeyer S, Schottmann R, Kohlhaw K, Wonigeit K, Sewing KF. 1989.** Urinary excretion of cyclosporin and 17 of its metabolites in renal allograft recipients. *Pharmacology* **39**: 160-164.
- Bleck JS, Nashan B, Christians U, Schottmann R, Wonigeit K, Sewing KF. 1990.** Single dose pharmacokinetics of cyclosporin and its main metabolites after oral cyclosporin as oily solution or capsule. *Arzneimittelforschung.* **40**: 62-64.
- Bleck JS, Schlitt HJ, Christians U, Schottmann R, Thiesemann C, Strohmeyer S, Kohlhaw K, Wonigeit K, Pichlmayr R, Sewing KF. 1991.** Cyclosporin metabolite pattern in blood and urine of kidney graft patients in relation to liver function. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* **40**: 565-569.
- Bloemena E, van Oers MH, Weinreich S, Schellekens PT. 1988.** Cyclosporin A and prednisolone do not inhibit the expression of high- affinity receptors for interleukin 2. *Clin.Exp.Immunol.* **71**: 308-313.
- Bobadilla NA, Tapia E, Franco M, Lopez P, Mendoza S, Garcia-Torres R, Alvarado JA, Herrera-Acosta J. 1994.** Role of nitric oxide in renal hemodynamic abnormalities of cyclosporin nephrotoxicity. *Kidney Int.* **46**: 773-779.
- Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, Garcia-Torres R, Bolio A, Lopez-Zetina P, Herrera-Acosta J. 1998.** Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression. *Am.J.Physiol* **274**: F791-F798.
- Bokenkamp A, Offner G, Hoyer PF, Vester U, Wonigeit K, Brodehl J. 1995.** Improved absorption of cyclosporin A from a new microemulsion formulation: implications for dosage and monitoring. *Pediatr.Nephrol.* **9**: 196-198.
- Borel JF. 1986.** Cyclosporin and its future. *Prog.Allergy* **38**: 9-18.
- Borel JF, Baumann G, Chapman I, Donatsch P, Fahr A, Mueller EA, Vigouret JM. 1996.** In vivo pharmacological effects of cyclosporin and some analogues. *Adv.Pharmacol.* **35**: 115-246.

- Bourdat-Michel G, Dechelette E, Serre-Debeauvais F, Bost M, Beaudoin A. 1990.** [Pharmacokinetic of cyclosporin A]. *Pediatric*. **45**: 571-575.
- Brabletz T, Pfeuffer I, Schorr E, Siebelt F, Wirth T, Serfling E. 1993.** Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. *Mol.Cell Biol*. **13**: 1155-1162.
- Bram RJ, Hung DT, Martin PK, Schreiber SL, Crabtree GR. 1993.** Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: roles of calcineurin binding and cellular location. *Mol.Cell Biol*. **13**: 4760-4769.
- Brando B, Civati G, Busnach G, Broggi ML, Seveso M, Belli LS, Brunati C, Minetti L. 1986.** Cyclosporin does not inhibit the early steps of lymphocyte activation. *Contrib.Nephrol*. **51**: 19-22.
- Brennan DC, Barbeito R, Burke J, Brayman K, Greenstein S, Chang T. 1999.** Safety of Neoral conversion in maintenance renal transplant patients: A one-year, double-blind study. NOVARTIS OLN-353 Study Group. *Kidney Int*. **56**: 685-691.
- Brunner et al. 2000.** Effect of dose on cyclosporine induced suppression of hepatic cytochrome P450 3A2 and 2C11. *Eur.J.Pharm.Biopharm*. **49**: 129-35.
- Browne BJ, Jordan S, Welsh MS, Van Buren C, Kahan BD. 1994.** Diet and cyclosporin A--pharmacokinetic comparison between Neoral and Sandimmune gelatin capsules. *Transplant.Proc*. **26**: 2959-2960.
- Byrnskov J, Tvede N. 1990.** Plasma interleukin-2 and a soluble/shed interleukin-2 receptor in serum of patients with Crohn's disease. Effect of cyclosporin. *Gut* **31**: 795-799.
- Buchholz B, Korn A. 1996.** Safety and tolerability of Sandimmun Neoral vs Sandimmune in de novo renal transplant patients after 24 months' treatment. German Neoral Study Group. *Transplant.Proc*. **28**: 2187-2188.
- Bunchman TE, Parekh RS, Flynn JT, Smoyer WE, Kershaw DB, Valentini RP, Pontillo BJ, Sandvordenker J, Brown C, Sedman AB. 1998.** Neoral induction in pediatric renal transplantation. *Pediatr.Nephrol*. **12**: 2-5.
- Bunikowski R, Gerhold K, Brautigam M, Hamelmann E, Renz H, Wahn U. 2001.** Effect of low-dose cyclosporin a microemulsion on disease severity, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha production in severe pediatric atopic dermatitis. *Int.Arch.Allergy Immunol*. **125**: 344-348.
- Burdick JF. 2001** A general Approach to broader sharing in Organ Allocation. *Transplantation*. **72**: 759-63.
- Butani L, Makker SP. 2000.** Conversion from tacrolimus to neoral for postrenal transplant diabetes. *Pediatr.Nephrol*. **15**: 176-178.
- Caillat-Zucman S, Chatenoud L, Bach JF. 1989.** In vitro and in vivo action of cyclosporin A on the induction of human interleukin-2 receptor alpha and beta chains. *Clin.Exp.Immunol*. **77**: 184-190.
- Cairns HS, Rogerson M, Fairbanks LD, Westwick J, Neild GH. 1988.** Endothelin and cyclosporin nephrotoxicity. *Lancet* **2**: 1496-1497.
- Canadian Neoral Renal Transplantation Study Group. 2001.** Absorption profiling of cyclosporine microemulsion (neoral) during the first 2 weeks after renal transplantation. *Transplantation* **72**: 1024-1032.
- Canafax DM, Irish WD, Moran HB, Squiers E, Levy R, Pouletty P, First MR, Christians U. 1999.** An individual bioequivalence approach to compare the intrasubject variability of two cyclosporin formulations, SangCya and Neoral. *Pharmacology* **59**: 78-88.
- Cantarovich M, Barkun JS, Tchervenkov JI, Besner JG, Aspeslet L, Metrakos P. 1998.** Comparison of neoral dose monitoring with cyclosporine through levels versus 2-hr postdose levels in stable liver transplant patients. *Transplantation* **66**: 1621-1627.

- Cantarovich M, Besner JG, Barkun JS, Elstein E, Loertscher R. 1998.** Two-hour cyclosporine level determination is the appropriate tool to monitor Neoral therapy. *Clin.Transplant.* **12**: 243-249.
- Cantarovich M, Barkun J, Besner JG, Metrakos P, Alpert E, Deschenes M, Aalamian Z, Tchervenkov JI. 1998.** Cyclosporine peak levels provide a better correlation with the area- under-the-curve than trough levels in liver transplant patients treated with neoral. *Transplant.Proc.* **30**: 1462-1463.
- Capasso G, Ciani F, De Tommaso G, Rizzo A, De Santo NG. 1990.** Atrial natriuretic peptide and ciclosporin nephrotoxicity. *Contrib.Nephrol.* **83**: 216-221.
- Carmellini M, Di Stefano R, Pietrabissa A, Oleggini M, Rizzo G, Rindi P, Palla R, Mosca F. 1990.** Acute ciclosporin nephrotoxicity in renal transplant patients. *Contrib.Nephrol.* **83** : 213-215.
- Caterson RJ, Duggin GG, Critchley L, Baxter C, Horvath JS, Hall BM, Tiller DJ. 1986.** Renal tubular transport of cyclosporine A (CSA) and associated changes in renal function. *Clin.Nephrol.* **25 Suppl 1**: S30-S33.
- Cattral MS, Hemming AW, Greig PD, Rowsell C, Chari R, Wright E, Donat D, Cole E, Levy GA. 1998.** Low incidence of rejection after synchronous pancreas-kidney transplantation with Neoral. *Transplant.Proc.* **30**: 1946.
- Chapman JR, O'Connell PJ, Bovington KJ, Allen RD. 1996.** Conversion from Sandimmune to Neoral in stable renal and pancreas transplant recipients enhances cyclosporine absorption. *Transplant.Proc.* **28**: 2293-2295.
- Charuk JH, Wong PY, Reithmeier RA. 1995.** Differential interaction of human renal P-glycoprotein with various metabolites and analogues of cyclosporin A. *Am.J.Physiol* **269**: F31-F39.
- Chaudhuri B 1, Stephan C. 1995.** Only in the presence of immunophilins can cyclosporin and FK506 disrupt in vivo binding of calcineurin A to its autoinhibitory domain yet strengthen interaction between calcineurin A and B subunits. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **215**: 781-790.
- Chaudhuri B 2, Hammerle M, Furst P. 1995.** The interaction between the catalytic A subunit of calcineurin and its autoinhibitory domain, in the yeast two-hybrid system, is disrupted by cyclosporin A and FK506. *FEBS Lett.* **357**: 221-226.
- Chehne F, Oguogho A, Lupattelli G, Budinsky AC, Palumbo B, Sinzinger H. 2001.** Increase of isoprostane 8-epi-PGF(2 alpha)after restarting smoking. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* **64**: 307-310.
- Chen Y, Morrow JD, Roberts LJ. 1999.** Formation of reactive cyclopentenone compounds in vivo as products of the isoprostane pathway. *J.Biol.Chem.* **274**: 10863-10868.
- Choc MG. 1997.** Bioavailability and pharmacokinetics of cyclosporine formulations: Neoral vs Sandimmune. *Int.J.Dermatol.* **36 Suppl 1**: 1-6.
- Choc MG, Mueller EA, Robinson WT, Kumle A, Smith HT, Charnick SB. 1998.** Relative bioavailability of Neoral versus Sandimmune in the presence of a P450III A and P-glycoprotein inhibitor. *Transplant.Proc.* **30**: 1664-1665.
- Christians U, Zimmer KO, Wonigeit K, Sewing KF. 1987.** Measurement of cyclosporin A and of four metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.* **413**: 121-129.
- Christians U, Zimmer KO, Wonigeit K, Maurer G, Sewing KF. 1988.** Liquid-chromatographic measurement of cyclosporin A and its metabolites in blood, bile, and urine. *Clin.Chem.* **34**: 34-39.
- Christians U, Kohlhaw K, Budniak J, Bleck JS, Schottmann R, Schlitt HJ, Almeida VM, Deters M, Wonigeit K, Pichlmayr R, . 1991.** Ciclosporin metabolite pattern in blood and urine of liver graft recipients. I. Association of ciclosporin metabolites with nephrotoxicity. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* **41**: 285-290.
- Christians U, Sewing KF. 1993.** Cyclosporin metabolism in transplant patients. *Pharmacol.Ther.* **57**: 291-345.
- Cifkova R, Hallen H. 2001.** Cyclosporin-induced hypertension. *J.Hypertens.* **19**: 2283-2285.

- Clipstone NA, Crabtree GR. 1993.** Calcineurin is a key signaling enzyme in T lymphocyte activation and the target of the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **696**: 20-30.
- Clozel JP, Fischli W, Menard J. 1993.** Effects of the blockade of the renin-angiotensin system in cyclosporin-induced hypertension. *J.Hypertens.* **11**: 75-81.
- Cogny-Van Weydevelt F, Dandavino R, Langlois S, Boucher A . 2000.** Cost analysis of kidney transplantation with cyclosporin A. *Transplant.Proc.* **32**: 434-435.
- Cole E, Cheung F, Wong PY, Fung LS, Skorecki K, Levy GA. 1989.** Toxic effects on renal cells in culture--a comparison of cyclosporin A and its metabolites. *Transplant.Proc.* **21**: 943-945.
- Cole EH. 2000.** Neoral monitoring: limitations of trough level monitoring and the potential role of limited sampling strategies. *Transplant.Proc.* **32**: 1556-1558.
- Collier SJ, Calne RY, White DJ, Winters S, Thiru S. 1986.** Blood levels and nephrotoxicity of cyclosporin A and G in rats. *Lancet* **1**: 216.
- Combalbert J, Fabre I, Fabre G, Dalet I, Derancourt J, Cano JP, Maurel P. 1989.** Metabolism of cyclosporin A. IV. Purification and identification of the rifampicin-inducible human liver cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) as a product of P450III<sub>A</sub> gene subfamily. *Drug Metab Dispos.* **17**: 197-207.
- Copeland KR et al. 1990.** Toxicity of cyclosporine metabolites. *Ther.Drug.Monit.* **12**: 525-532.
- Corbett J, Ross K. 1998.** Neoral: the new cyclosporine. *ANNA.J.* **25**: 71-72.
- Corbetta G, Brunati C. 1989.** [Pharmacokinetics and metabolism of cyclosporin A in liver transplant]. *Minerva Chir* **44**: 33-35.
- Cossu M, Satta R, Branca GF, Pala PG, Serra G, Satta RP, Sorba G. 1998.** Conversion to cyclosporine microemulsion (Neoral) in stable renal transplant patients: results from a single center. *Transplant.Proc.* **30**: 1762-1763.
- Coukell AJ, Plosker GL. 1998.** Cyclosporin microemulsion (Neoral). A pharmacoeconomic review of its use compared with standard cyclosporin in renal and hepatic transplantation. *Pharmacoeconomics.* **14**: 691-708.
- Cunningham C, Gavin MP, Whiting PH, Burke MD, Macintyre F, Thomson AW, Simpson JG. 1984.** Serum cyclosporin levels, hepatic drug metabolism and renal tubulotoxicity. *Biochem.Pharmacol.* **33**: 2857-2861.
- Cunningham C, Burke MD, Wheatley DN, Thomson AW, Simpson JG, Whiting PH. 1985.** Amelioration of cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats by induction of hepatic drug metabolism. *Biochem.Pharmacol.* **34**: 573-578.
- Curtis JJ. 1996.** Case reports on conversion to Neoral therapy in renal transplant patients. *Transplant.Proc.* **28**: 2221-2222.
- D'Agati VD. 1995.** Morphologic features of cyclosporin nephrotoxicity. *Contrib.Nephrol.* **114**: 84-110.
- Davenport A, Will EJ, Davison AM, Ironside JW. 1988.** Toxicity of cyclosporin metabolites. *Lancet* **2**: 333.
- Davies DR, Bittmann I, Pardo J. 2000.** Histopathology of calcineurin inhibitor induced nephrotoxicity. *Transplantation* **69 Supp12**: S11-S13.
- Dawidson I, Rooth P, Fisher D, Fry WR, Alway C, Coorpender L, Reisch J. 1989.** Verapamil ameliorates acute cyclosporine A (CsA) nephrotoxicity and improves immunosuppression after cadaver renal transplantation. *Transplant.Proc.* **21**: 1511-1513.
- de Heer E, Davidoff A, van der WA, van Geest M, Paul LC. 1994.** Chronic renal allograft rejection in the rat. Transplantation-induced antibodies against basement membrane antigens. *Lab Invest* **70**: 494-502.

- de Keijzer MH, Provoost AP, van Aken M, Kort WJ, Wolff ED, Molenaar JC. 1985.** Effect of cyclosporin A on the development of posttransplantation hypertension in rat renal allograft recipients. *Nephron* **40**: 57-62.
- De Palma MT, Giordano M, Colella V, Palumbo F, De Nicolo VE, Caringella DA. 1998.** Sandimmun and Neoral treatment: pharmacokinetics and kidney function in paediatric and adolescent renal transplant. *Transplant.Proc.* **30**: 1677.
- Demeule M, Laplante A, Sepehr-Arae A, Beaulieu E, Averill-Bates D, Wenger RM, Beliveau R. 1999.** Inhibition of P-glycoprotein by cyclosporin A analogues and metabolites. *Biochem.Cell Biol.* **77**: 47-58.
- Denesyuk AI, Korpela T, Lundell J, Sara R, Zav'yalov VP. 1993.** Comparison of conformations of cyclosporin A and macrolide FK506 fragments: localization of putative binding sites with phosphatase calcineurin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **194**: 280-286.
- Deray G, Baumelou B, Le Hoang P, Aupetit B, Girard B, Baumelou A, Legrand JC, Jacobs C. 1989.** Enhancement of cyclosporin nephrotoxicity by diuretic therapy. *Clin.Nephrol.* **32**: 47.
- Devlin J, Williams R, Neuhaus P, McMaster P, Calne R, Pichlmayr R, Otto G, Bismuth H, Groth C. 1994.** Renal complications and development of hypertension in the European study of FK 506 and cyclosporin in primary liver transplant recipients. *Transpl.Int.* **7 Suppl 1**: S22-S26.
- Dick AD, Towler HM, Whiting P, Forrester JV. 1992.** The use of lithium clearance studies in the early detection of cyclosporin A (CsA) nephrotoxicity: a protocol of renal function assessment with CsA therapy. *Curr.Eye Res.* **11 Suppl**: 215-218.
- Dieperink H, Leyssac PP, Kemp E, Starklint H, Frandsen NE, Tvede N, Moller J, Buchler FP, Rossing N. 1987.** Nephrotoxicity of cyclosporin A in humans: effects on glomerular filtration and tubular reabsorption rates. *Eur.J.Clin.Invest* **17**: 493-496.
- Dieperink H, Leyssac PP, Starklint H, Kemp E. 1988.** Long-term cyclosporin nephrotoxicity in the rat: effects on renal function and morphology. *Nephrol.Dial.Transplant.* **3**: 317-326.
- Dieperink H. 1989.** Cyclosporin A nephrotoxicity. *Dan.Med.Bull.* **36**: 235-248.
- Dobson et al. 1999.** Characterization of Protein Ser/Thr phosphatases of the malaria parasite, Plasmodium falciparum: Inhibition of the parasitic CaN by CYP-CsA complex. *Mol.Bioch.Parasitol.* **99**: 167-81.
- Donatsch P et al. 1986.** Pharmacokinetics of cyclosporine in toxicological studies gelatin capsules. *Transplant.Proc.* **26**: 2959-2960.
- Ducharme MP, Verret L, Brouillette D, Sirois G. 1998.** Ability of a first-pass pharmacokinetic model to characterize cyclosporine blood concentrations after administrations of Sandimmune or Neoral formulations. *Ther.Drug Monit.* **20**: 165-171.
- Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, Plosker GL, Goa KL. 2001.** Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)1 in organ transplantation. *Drugs* **61**: 1957-2016.
- Elliott JF, Lin Y, Mizel SB, Bleackley RC, Harnish DG, Paetkau V. 1984.** Induction of interleukin 2 messenger RNA inhibited by cyclosporin A. *Science* **226**: 1439-1441.
- Erkko P, Granlund H, Nuutinen M, Reitamo S. 1997.** Comparison of cyclosporin A pharmacokinetics of a new microemulsion formulation and standard oral preparation in patients with psoriasis. *Br.J.Dermatol.* **136**: 82-88.
- Ettenger RE, Smith HT, Kaiser B, Cooney GF, Summerauer J, Alexander S, Moulton LT, Choc MG, Wong RL. 1996.** Use of Neoral in pediatric renal transplantation. *Transplant.Proc.* **28**: 2257-2258.
- Etzkorn FA, Chang ZY, Stolz LA, Walsh CT. 1994.** Cyclophilin residues that affect noncompetitive inhibition of the protein serine phosphatase activity of calcineurin by the cyclophilin.cyclosporin A complex. *Biochemistry* **33**: 2380-2388.



- Fabre JM, Pedrosa R, Bonardet A, Pichard L, Descomps B, Domergue J, Baumel H, Maurel P. 1992.** [Cyclosporin A metabolism and induction of cytochrome P-450 in orthoptic hepatic transplantation in rats]. *Chirurgie* **118**: 665-671.
- Fakata KL, Elmquist WF, Swanson SA, Vorce RL, Prince C, Stemmer PM. 1998.** Cyclosporin A has low potency as a calcineurin inhibitor in cells expressing high levels of P-glycoprotein. *Life Sci.* **62**: 2441-2448.
- Faulds D, Goa KL, Benfield P. 1993.** Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs* **45**: 953-1040.
- Farge D et al. 1998.** Effects of transplantation on the renin angiotensin system. *J.Hum.Hypertens.* **12**: 827-832.
- Ferrea G, Fioredda F, Loy A, Mangraviti S, Rossi G, Bassetti D. 1994.** Oral microemulsion formulation substitutes for intravenous cyclosporin in child with graft-versus-host disease. *Lancet* **344**: 480-481.
- Feutren G, Wong R, Jin J, Niese D, Mellein B. 1996.** Safety and tolerability of Neoral in transplant recipients. *Transplant.Proc.* **28**: 2177-2182.
- Filler G, Mai I, Filler S, Ehrich JH. 1999.** Abbreviated cyclosporine AUCs on Neoral--the search continues! *Pediatr.Nephrol.* **13**: 98-102.
- First MR, Weiskittel P, Shah M, Peddi VR, Canafax D, Schroeder TJ. 1998.** Conversion of stable renal transplant recipients from Sandimmune to Sang-35, a Neoral-equivalent cyclosporine formulation, using a dose-adjusted method. *Transplant.Proc.* **30**: 3955-3957.
- First MR, Alloway R, Schroeder TJ. 1998.** Development of Sang-35: a cyclosporine formulation bioequivalent to Neoral. *Clin.Transplant.* **12**: 518-524.
- First MR. 2001** Tailoring immunosuppressive Therapy based on Donor and Recipient Risk Factors. *Transplant.Proceed.* **33**: 2207-11.
- Fisher RA, Pan SH, Rossi SJ, Schroeder TJ, Irish WD, Canafax DM, Lopez RR. 1999.** Pharmacokinetic comparison of two cyclosporine A formulations, SangCya (Sang-35) and Neoral, in stable adult liver transplant recipients. *Transplant.Proc.* **31**: 394-395.
- Fitzpatrick L, Kaiser M, Stewart BH, Hoskin DW. 1994.** Effect of interferon-gamma, interleukin-2 and interleukin-4 on cyclosporin-A-mediated inhibition of anti-CD3-induced T-lymphocyte proliferation. *Int.J.Immunopharmacol.* **16**: 289-293.
- Fletcher SJ, Bacchus RA. 1988.** A simple improved method for the measurement of cyclosporin by liquid- liquid extraction of whole blood and isocratic HPLC. *Ann.Clin.Biochem.* **25 ( Pt 5)**: 510-515.
- Foor F, Parent SA, Morin N, Dahl AM, Ramadan N, Chrebet G, Bostian KA, Nielsen JB. 1992.** Calcineurin mediates inhibition by FK506 and cyclosporin of recovery from alpha-factor arrest in yeast. *Nature* **360**: 682-684.
- Foradori A, Pinto VM, Elberg A. 1998.** A critical appraisal of cyclosporine A pharmacokinetics in pediatric kidney transplantation using a microemulsion galenic formulation (Neoral). *Transplant.Proc.* **30**: 1666-1667.
- Foradori AC, Martinez L, Elberg A, Vaccarezza A, Loveluck A, Pinto C. 1995.** Preliminary pharmacokinetic evaluation of a new galenical formulation of oral cyclosporine A: Neoral TM. *Transplant.Proc.* **27**: 1813-1814.
- Frei U, Taesch S, Niese D. 1994.** Use of Sandimmun Neoral in renal transplant patients. International Sandimmun Neoral Study Group. *Transplant.Proc.* **26**: 2928-2931.
- Frei U. 1999.** Overview of the clinical experience with Neoral in transplantation. *Transplant.Proc.* **31**: 1669-1674.
- Friman S, Backman L. 1996.** A new microemulsion formulation of cyclosporin: pharmacokinetic and clinical features. *Clin.Pharmacokinet.* **30**: 181-193.

- Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ. 1992.** Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**: 3686-3690.
- Fuggle SV, McWhinnie DL, Morris PJ. 1989.** Immunohistological analysis of renal allograft biopsies from cyclosporin-treated patients. Induced HLA-class II antigen expression does not exclude a diagnosis of cyclosporin nephrotoxicity. *Transpl.Int.* **2**: 123-128.
- Fujita M, Iida H, Asaka M, Izumino K, Takata M, Sasayama S. 1991.** Effect of the immunosuppressive agent, ciclosporin, on experimental immune complex glomerulonephritis in rats. *Nephron* **57**: 201-205.
- Fukunaga M, Takahashi K, Badr KF. 1993.** Vascular smooth muscle actions and receptor interactions of 8-iso-prostaglandin E2, an E2-isoprostane. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **195**: 507-515.
- Fukunaga M, Yura T, Badr KF. 1995.** Stimulatory effect of 8-Epi-PGF2 alpha, an F2-isoprostane, on endothelin-1 release. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **26 Suppl 3**: S51-S52.
- Gardner LB, Guttman RD, Merrill JP. 1968.** Renal transplantation in the inbred rat. IV. Alterations in the microvasculature in acute unmodified rejection. *Transplantation* **6**: 411-418.
- Gaspari F, Anedda MF, Signorini O, Remuzzi G, Perico N. 1997.** Prediction of cyclosporine area under the curve using a three-point sampling strategy after Neoral administration. *J.Am.Soc.Nephrol.* **8**: 647-652.
- Gaston R, Alloway RR, Gaber AO, Rossi SJ, Schroeder TJ, Irish WD, Canafax DM, First MR. 1999.** Pharmacokinetic and safety evaluation of SangCya vs Neoral or Sandimmune in stable renal transplant recipients. *Transplant.Proc.* **31**: 326-327.
- Gentil Govantes MA, Gomez UP, Errasti P, Fernandez FG, Capdevila L, Sanz GA, Cubero JJ. 1998.** Improvement of correlation between oral dose of cyclosporine and cyclosporinemia after substitution of cyclosporine standard presentation by cyclosporine microemulsion one, in 1345 patients with kidney transplantation. Spanish Sandimmune Neoral Conversion Group. *Transplant.Proc.* **30**: 1658-1659.
- Ghasemian SR, Light JA, Currier C, Sasaki TM, Aquino A. 1999.** Tacrolimus vs Neoral in renal and renal/pancreas transplantation. *Clin.Transplant.* **13**: 123-125.
- Gibson. 1999.** NO in CsA induced Hypertension: Role of Protein Kinase C. *Am.J.Hypert.* **12**: 1091-97.
- Gopaul NK, Zacharowski K, Halliwell B, Anggard EE. 2000.** Evaluation of the postprandial effects of a fast-food meal on human plasma F(2)-isoprostane levels. *Free Radic.Biol.Med.* **28**: 806-814.
- Granelli-Piperno A. 1988.** In situ hybridization for interleukin 2 and interleukin 2 receptor mRNA in T cells activated in the presence or absence of cyclosporin A. *J.Exp.Med.* **168**: 1649-1658.
- Grant D, Kneteman N, Tchervenkov J, Roy A, Murphy G, Tan A, Hendricks L, Guilbault N, Levy G. 1999.** Peak cyclosporine levels (Cmax) correlate with freedom from liver graft rejection: results of a prospective, randomized comparison of neoral and sandimmune for liver transplantation (NOF-8). *Transplantation* **67**: 1133-1137.
- Graziadei IW, Wiesner RH, Marotta PJ, Porayko MK, Dahlke LJ, Wilson SM, Steers JL, Krom RA. 1997.** Neoral compared to Sandimmune is associated with a decrease in histologic severity of rejection in patients undergoing primary liver transplantation. *Transplantation* **64**: 726-731.
- Grevel J. 1986.** Pharmacokinetics, metabolism and interactions of ciclosporin. *Contrib.Nephrol.* **51**: 23-30.
- Grobecker HF, Riebel K, Wellenhofer T. 1995.** CsA induced Hypertension in SHR and WKY Rats: Role of the Sympatho-adrenal System. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* **22S**: 994-5.
- Gu YL, Dahmen U, Doebel L, Li J, Dirsch O, Polywka S, Broelsch CE. 2001.** Influence of CsA treatment on adoptive transfer of immunity after allogeneic kidney transplantation in rats. *Transplant.Proc.* **33**: 398-400.

- Guo J, Ping Q, Chen Y. 2001.** Pharmacokinetic behavior of cyclosporin A in rabbits by oral administration of lecithin vesicle and Sandimmun Neoral. *Int.J.Pharm.* **216**: 17-21.
- Gupta E, Safa AR, Wang X, Ratain MJ. 1996.** Histologic grading of acute renal allograft rejection. *TransplantProc.* **31**: 1309-1696-1700.
- Gupta RK, Jain M. 1999.** Pharmacokinetic modulation of irinotecan and metabolites by cyclosporin A. *Cancer Res.* **56**: 1309-1314.
- Gurbuz V et al. 1997.** Oxidative Organ Damage in a Rat Model of thermal injury: the effect of Cyclosporine A. *Burns* **23**: 37-42.
- Gusmano R, Basile GC, Perfumo F, Ginevri F, Verrina E, Famularo L, Corbetta G. 1998.** Pharmacokinetics of oral cyclosporine microemulsion formulation (Neoral) in children awaiting renal transplantation. *Transplant.Proc.* **30**: 1985-1987.
- Guttmann RD, Lindquist RR, Parker RM, Carpenter CB, Merrill JP. 1967.** Renal transplantation in the inbred rat. I. Morphologic, immunologic, and functional alterations during acute rejection. *Transplantation* **5**: 668-681.
- Guttmann RD, Lindquist RR, Ockner SA. 1969.** Renal transplantation in the inbred rat. IX. Hematopoietic origin of an immunogenic stimulus of rejection. *Transplantation* **8**: 472-484.
- Guttmann RD, Lindquist RR, Merrill JP. 1969.** Renal transplantation in the inbred rat. 8. Quantitation of cell proliferation during unmodified rejection. *Transplantation* **8**: 19-27.
- Haas M, Mayer G. 1997.** Cyclosporin A-associated hypertension--pathomechanisms and clinical consequences. *Nephrol.Dial.Transplant.* **12**: 395-398.
- Haddy A, Swanson SK, Born TL, Rusnak F. 1992.** Inhibition of calcineurin by cyclosporin A-cyclophilin requires calcineurin B. *FEBS Lett.* **314**: 37-40.
- Halloran PF, Wadgymar A, Autenried P. 1986.** Inhibition of MHC product induction may contribute to the immunosuppressive action of ciclosporin. *Prog.Allergy* **38**: 258-268.
- Hamilton DV, Evans DB, Henderson RG, Thiru S, Calne RY, White DJ, Carmichael DJ. 1981.** 'Nephrotoxicity' and metabolic acidosis in transplant patients on cyclosporin A. *Proc.Eur.Dial.Transplant.Assoc.* **18**: 400-409.
- Hamilton G, Havel M, Laczkovics A, Muhlbacher F. 1988.** Ciclosporin dose-response relationship in heart transplant recipients as calculated from HPLC determinations. *Bibl.Cardiol.* 39-41.
- Hansen JM, Fogh-Andersen N, Leyssac PP, Strandgaard S. 1998.** Glomerular and tubular function in renal transplant patients treated with and without ciclosporin A. *Nephron* **80**: 450-457.
- Harris DT, Kozumbo WJ, Cerutti PA, Cerottini JC. 1987.** Mechanism of cyclosporin A-induced immunosuppression. Cyclosporin A inhibits receptor-mediated and non-receptor-mediated lymphokine production as well as interleukin-2-induced proliferation in cloned T lymphocytes. *Cell Immunol.* **109**: 104-114.
- Haug III M et al. 2000.** Problems with the automatic switching of generic cyclosporine oral solution for the innovator product. *Am.J.HealthSys.Pharm.* **57**: 1349-53.
- Hayry P, von Willebrand E, Ahonen J. 1983.** Differential diagnosis of Cyclosporin A nephrotoxicity versus rejection by fine needle aspiration biopsy. *Proc.Eur.Dial.Transplant.Assoc.* **20**: 356-361.
- Heering P, Kutkuhn B, Kreuzpaintner G, Reinhard T, Sundmacher R, Grabensee B. 1991.** [Kidney function of patients with healthy kidneys during cyclosporin treatment]. *Klin.Wochenschr.* **69**: 880-886.
- Heering P, Strobach H, Schror K, Grabensee B. 1992.** The role of thromboxane and prostacyclin in ciclosporin-induced nephrotoxicity. *Nephron* **61**: 26-31.

- Helderman JH. 1999.** Lessons from the Neoral Global Database for renal transplantation. *Transplant.Proc.* **31**: 1659-1663.
- Helmersson J, Basu S. 1999.** F2-isoprostane excretion rate and diurnal variation in human urine. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* **61**: 203-205.
- Helmersson J, Basu S. 2001.** F(2)-isoprostane and prostaglandin F(2alpha)metabolite excretion rate and day to day variation in healthy humans. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* **65**: 99-102.
- Hemming AW, Greig PD, Cattral MS, Chung SW, Lilly LB, Aljumah AA, Levy GA. 1997.** Neoral without intravenous cyclosporine in liver transplantation. *Transplant.Proc.* **29**: 543.
- Higgins RM, Hart P, Lam FT, Kashi H. 2000.** Conversion from tacrolimus to cyclosporin in stable renal transplant patients: safety, metabolic changes, and pharmacokinetic comparison. *Transplantation* **70**: 199-202.
- Hilbrands LB, Hoitsma AJ, van den Berg JW, Koene RA. 1991.** Cyclosporin A blood levels during use of cyclosporin as oral solution or in capsules: comparison of pharmacokinetic parameters. *Transpl.Int.* **4**: 125-127.
- Holt DW, Mueller EA, Kovarik JM, van Bree JB, Kutz K. 1994.** The pharmacokinetics of Sandimmun Neoral: a new oral formulation of cyclosporine. *Transplant.Proc.* **26**: 2935-2939.
- Holt DW, Mueller EA, Kovarik JM, van Bree JB, Richard F, Kutz K. 1995.** Sandimmun neoral pharmacokinetics: impact of the new oral formulation. *Transplant.Proc.* **27**: 1434-1437.
- Humbert H. 1997.** [Variability of the bioavailability of cyclosporine: benefit of the Neoral formulation]. *Therapie* **52**: 353-357.
- Imventarza O, Lendoire J, Bianco G, Saul J, Braslavsky G, Trigo P, Cueto G, Duek F, Aziz H. 1998.** Low incidence of acute cellular rejection in liver transplantation with Neoral. *Transplant.Proc.* **30**: 1854.
- Ivery MT. 1999.** A proposed molecular model for the interaction of calcineurin with the cyclosporin A-cyclophilin A complex. *Bioorg.Med.Chem.* **7**: 1389-1402.
- Jadoul M, Pirson Y, van Ypersele dS. 1991.** Drugs potentiating cyclosporin nephrotoxicity. *Nephron* **58**: 383-384.
- Jansson LJ. 2000.** Isoprostanes: Generation, Pharmacology and Roles in Free-Radical mediated Effects in the Lung. *Pulmo.Pharmacol.Ther.* **13**: 149-155.
- Johnson DW, Saunders HJ, Field MJ, Pollock CA. 1999.** In vitro effects of simvastatin on tubulointerstitial cells in a human model of cyclosporin nephrotoxicity. *Am.J.Physiol* **276**: F467-F475.
- Johnston A, David OJ, Cooney GF. 2000.** Pharmacokinetic validation of neoral absorption profiling. *Transplant.Proc.* **32**: 53S-56S.
- Jones SR, Gunson B, McLean S, McMaster P, Ratcliffe JG. 1988.** Cyclosporine levels in whole blood. Comparison of the polyclonal Sandoz Cyclosporin Radioimmunoassay Kit with the specific antibody in the new Sandimmun Kit. *Transplantation* **45**: 991-992.
- Jordan SC, Querfeld U, Toyoda M, Prehn J. 1990.** Serum interleukin-2 levels in a patient with focal segmental glomerulosclerosis. Relationship to clinical course and cyclosporin A therapy. *Pediatr.Nephrol.* **4**: 166-168.
- Kabasakul SC, Clarke M, Kane H, Karsten J, Clark G. 1997.** Comparison of Neoral and Sandimmun cyclosporin A pharmacokinetic profiles in young renal transplant recipients. *Pediatr.Nephrol.* **11**: 318-321.
- Kahan BD, Flechner SM, Lorber MJ, Van Buren CT. 1986.** Management of chronic cyclosporin-related nephrotoxicity. *Contrib.Nephrol.* **51**: 96-101.
- Kahan BD, Welsh M, Knight R, Katz S, Lewis R, Grevel J, Van Buren CT. 1992.** Pharmacokinetic strategies for cyclosporin therapy in organ transplantation. *J.Autoimmun.* **5 Suppl A**: 333-341.

- Kahan BD, Dunn J, Fitts C, Van Buren D, Wombolt D, Pollak R, Carson R, Alexander JW, Chang C, Choc M, . 1994.** The Neoral formulation: improved correlation between cyclosporine trough levels and exposure in stable renal transplant recipients. *Transplant.Proc.* **26**: 2940-2943.
- Karanth S, Lyson K, McCann SM. 1994.** Cyclosporin A inhibits interleukin-2-induced release of corticotropin-releasing hormone. *Neuroimmunomodulation.* **1**: 82-85.
- Kasiske BL, Cohen D et al. 2000.** Payment for Immunosuppression after Organtransplantation. *JAMA.* **10**: 2445-50.
- Kattner A, Ringe B, Haller GW, Kirchner G, Sewing KF, Winkler M. 1998.** Early use and oral absorption of cyclosporine neoral after liver transplantation. *Transplant.Proc.* **30**: 1422-1423.
- Kawai R, Lemaire M, Steimer JL, Bruelisauer A, Niederberger W, Rowland M. 1994.** Physiologically based pharmacokinetic study on a cyclosporin derivative, SDZ IMM 125. *J.Pharmacokinet.Biopharm.* **22**: 327-365.
- Keller F, Kunzendorf U, Walz G, Schwarz A, Offermann G. 1990.** Slow accumulation of cyclosporin metabolites as measured by specific and nonspecific cyclosporin RIA. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.Toxicol.* **28**: 167-175.
- Kelles A, Damme-Lombaerts R, Tjandra-Maga TB, Van Damme B. 1996.** Long-term cyclosporin A pharmacokinetic profiles in pediatric renal transplant recipients. *Transpl.Int.* **9**: 546-550.
- Kempkes-Koch M et al. 2001.** Cyclosporine A Metabolite AM19 as a Potential Biomarker in Urine for CsA Nephropathy. *Transplant.Proceed.* **33**: 2167-69.
- Keown P, Niese D. 1998.** Cyclosporine microemulsion increases drug exposure and reduces acute rejection without incremental toxicity in de novo renal transplantation. International Sandimmun Neoral Study Group. *Kidney Int.* **54**: 938-944.
- Keown PA. 1996.** Use of cyclosporine microemulsion (Neoral) in de novo and stable renal transplantation: clinical impact, pharmacokinetic consequences and economic benefits. Canadian and International Neoral Study Groups. *Transplant.Proc.* **28**: 2147-2150.
- Khanna AK, Cairns VR, Becker CG, Hosenpud JD. 1998.** TGF-beta: a link between immunosuppression, nephrotoxicity, and CsA. *Transplant.Proc.* **30**: 944-945.
- Khoschorur G, Semmelrock HJ, Rodl S, Auer T, Petek W, Iberer F, Tscheliessnigg KH. 1997.** Rapid, sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of cyclosporin A and its metabolites M1, M17 and M21. *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* **690**: 367-372.
- Khoss AE, Hamilton G, Illievich V, Muhlbacher F, Roth E, Steger H, Wladika W, Howanietz H, Balzar E. 1988.** Ciclosporin monitoring in kidney-transplanted children: high- performance liquid chromatography versus radioimmunoassay. *Child Nephrol.Urol.* **9**: 42-45.
- Kim HY, Min WS, Moon H, Bang BK, Lee KS, Kim DJ. 1987.** Interleukin-2 effect on the inhibition of mixed lymphocyte reaction induced by cyclosporin A. *Korean J.Intern.Med.* **2**: 184-189.
- Kim SC, Han DJ. 1998.** Neoplanta as a new microemulsion formula of cyclosporine in renal transplantation: comparative study with Neoral for efficacy and safety. *Transplant.Proc.* **30**: 3547-3548.
- Kingma I, Ludwin D, Dandavino R, Wolff JL, Loertscher R, Beauregard-Zollinger L, Bacquet P, Boucher S, Riviere M. 1997.** Economic analysis of Neoral in de novo renal transplant patients in Canada. *Clin.Transplant.* **11**: 42-48.
- Kinsella BT, O'Mahony DJ, FitzGerald GA. 1997.** The human thromboxane A2 receptor alpha isoform (TP alpha) functionally couples to the G proteins Gq and G11 in vivo and is activated by the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **281**: 957-964.

- Klauser R, Irschik H, Kletzmayer J, Sturm I, Brunner W, Woloszczuk W, Kovarik J. 1995.** Neoral--a new microemulsion formula of cyclosporine A: interpatient pharmacokinetic variability in renal transplant recipients. *Transplant.Proc.* **27**: 3427-3429.
- Klauser RM, Irschik H, Kletzmayer J, Sturm I, Brunner W, Woloszczuk W, Kovarik J. 1997.** Pharmacokinetic cyclosporine A profiles under long-term Neoral treatment in renal transplant recipients: does fat intake still matter? *Transplant.Proc.* **29**: 3137-3140.
- Klein T, Reutter F, Schweer H, Seyberth HW, Nusing RM. 1997.** Generation of the isoprostane 8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub>alpha in vitro and in vivo via the cyclooxygenases. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **282**: 1658-1665.
- Klintmalm GB, Iwatsuki S, Starzl TE. 1981.** Nephrotoxicity of cyclosporin A in liver and kidney transplant patients. *Lancet* **1**: 470-471.
- Kolars JC, Awni WM, Merion RM, Watkins PB. 1991.** First-pass metabolism of cyclosporin by the gut. *Lancet* **338**: 1488-1490.
- Kopp JB, Klotman PE. 1990.** Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. *J.Am.Soc.Nephrol.* **1**: 162-179.
- Kopsa H, Lapin A, Derfler K, Stockenhuber F, Sunder-Plassmann G, Balcke P, Smetana R, Gebhart W. 1989.** Does cyclosporin A affect neurotransmitters? Studies after kidney transplantation. *Transplant.Proc.* **21**: 1506-1507.
- Krmar RT, Wuhl E, Ding R, Aulmann M, Scharer K. 1996.** Pharmacokinetics of a new microemulsion formulation of cyclosporin A (Neoral) in young patients after renal transplantation. *Transpl.Int.* **9**: 476-480.
- Kronbach T et al. 1988.** CsA metabolism in human liver: identification of a cytochrome P-450III gene family as the major CsA-metabolizing enzyme. *Clin.Pharmacol.Ther.* **43**: 630-5.
- Kullinger B, Steiner G, Woloszczuk W. 1989.** Immunosuppressive properties of cyclosporin metabolites. *Lancet* **2**: 333-334.
- Kumano K, Yoshida K, Iwamura M, Endo T, Sakai T, Nakamura K, Kuwao T. 1989.** The role for reactive oxygen species in cyclosporin A induced nephrotoxicity in rats. *Transplant.Proc.* **21**: 941-942.
- Kungsamrith T, Eiam-Ong S, Avihingsanon Y, Tungsanga K, Chusil S, Ayudhya DP. 2000.** Pharmacokinetic studies of cyclosporin in Thai kidney transplantation patients. *J.Med.Assoc.Thai.* **83**: 1307-1317.
- Kunzendorf U, Brockmoller J, Jochimsen F, Roots I, Offerman G. 1989.** Immunosuppressive properties of cyclosporin metabolites. *Lancet* **1**: 734-735.
- Kunzendorf U, Brockmoller J, Jochimsen F, Roots I, Offermann G. 1990.** Activity of cyclosporin metabolites M17 and M1. *Transplant.Proc.* **22**: 1697-1699.
- Kupiec-Weglinski JW, Sablinski T, Hancock WW, Mix CT, Tilney NL. 1991.** Synergistic interactions between anti-interleukin-2 receptor (IL-2R) MAb and CyA in sensitized rat recipients of cardiac allografts. *Transplant.Proc.* **23**: 285-286.
- Lacerda MA et al. 1995.** Hepatic levels of cyclosporine and metabolites in patients after liver transplantation. *Clin.Transplant.* **9**: 35-8.
- Lai KN, Lai FM, Chui SH, Leung KN, Lam CW. 1989.** Effect of ciclosporin on lymphocyte subpopulations and immunoglobulin production in IgA nephropathy. *Nephron* **52**: 307-312.
- Lampe D, Glende M, Blank W, Scholz D, Prumke HJ, Huller H. 1985.** [Blood level oriented ambulatory cyclosporin A therapy following kidney transplantation]. *Z.Urol.Nephrol.* **78**: 561-565.
- Lampen A, Christians U, Bader A, Hackbarth I, Sewing KF. 1996.** Drug interactions and interindividual variability of cyclosporin metabolism in the small intestine. *Pharmacology* **52**: 159-168.

- Land W. 2001.** Cyclosporin in der Transplantationsmedizin. *Thieme Verlag*.
- Leaker B, Cairns HS. 1994.** Clinical aspects of cyclosporin nephrotoxicity. *Br.J.Hosp.Med.* **52**: 529-534.
- Lee YJ, Chung SJ, Shim CK. 1998.** Bioequivalence of Neoplanda capsule to Sandimmune Neoral, microemulsion formulations of cyclosporin A in human subjects. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.* **36**: 210-215.
- Leimenstoll G. 1991.** [Effects of cyclosporin A dose on the function of the transplanted kidney. Peripheral mononuclear cells and histological findings in the transplant]. *Fortschr.Med.* **109**: 659-660.
- Leitinger N, Huber J, Rizza C, Mechtcheriakova D, Bochkov V, Koshelnick Y, Berliner JA, Binder BR. 2001.** The isoprostane 8-iso-PGF(2alpha) stimulates endothelial cells to bind monocytes: differences from thromboxane-mediated endothelial activation. *FASEB J.* **15**: 1254-1256.
- Lemaire M, Maurer G, Wood AJ. 1986.** Cyclosporin. Pharmacokinetics and metabolism. *Prog.Allergy* **38**: 93-107.
- Lemire J, Capparelli EV, Benador N, Grimm P, Macdonald D, Reznik V. 2001.** Neoral pharmacokinetics in Latino and Caucasian pediatric renal transplant recipients. *Pediatr.Nephrol.* **16**: 311-314.
- Leunissen KM, Beuman GH, Bosman F, van Hooff JP. 1986.** Cyclosporin metabolites and nephrotoxicity. *Lancet* **2**: 1398.
- Levy GA, Grant D. 1996.** Neoral in liver transplantation. *Transplant.Proc.* **28**: 1019-1021.
- Levy GA. 1998.** Neoral is superior to FK 506 in liver transplantation. *Transplant.Proc.* **30**: 1812-1815.
- Levy GA. 2001.** C2 monitoring strategy for optimising cyclosporin immunosuppression from the Neoral formulation. *BioDrugs.* **15**: 279-290.
- Li G, Treiber G, Meinshausen J, Wolf J, Werrigloer J, Klotz U. 1990.** Is cyclosporin A an inhibitor of drug metabolism? *Br.J.Clin.Pharmacol.* **30**: 71-77.
- Li W, Handschumacher RE. 1993.** Specific interaction of the cyclophilin-cyclosporin complex with the B subunit of calcineurin. *J.Biol.Chem.* **268**: 14040-14044.
- Libby P et al. 2001.** Chronic Rejection. *Immunity* **14**: 387-397.
- Lindquist RR, Guttman RD, Merrill JP. 1968.** Renal transplantation in the inbred rat. V. Histochemical studies of acute renal allograft rejection. *Am.J.Pathol.* **52**: 1145-1168.
- Lindquist RR, Guttman RD, Merrill JP. 1968.** Renal transplantation in the inbred rat. II. An immunohistochemical study of acute allograft rejection. *Am.J.Pathol.* **52**: 531-545.
- Lindquist RR, Guttman RD, Merrill JP. 1971.** Renal transplantation in the inbred rat. VII. Ultrastructure of the glomerulus during acute renal allograft rejection. *Transplantation* **11**: 1-9.
- Little DM, Stoltenberg RL, Hullett DA, Sollinger HW. 1996.** Effect of Neoral or cyclosporine on the development of chronic rejection in an aortic allograft rat model. *Transplant.Proc.* **28**: 880-881.
- Little AM et al. 1999.** Polymorphism of HLA Class I and II Genes and Molecules. *Rev.Immunogen.* **1**: 105-23.
- Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. 1991.** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP- FK506 complexes. *Cell* **66**: 807-815.
- Liu T, Stern A, Morrow JD. 1999.** The Isoprostanes: Unique Bioactive Products of Lipid Peroxidation. *J.Biomed.Sci.* **5**: 415-420

- Liu T, Stern A, Roberts LJ, Morrow JD. 1999.** The Isoprostanes: Novel Prostaglandins-Like Products of the Free Radical-Catalyzed Peroxidation of Arachidonic Acid. *J.Biomed.Sci.* **6**: 226-235
- Longmire AW, Roberts LJ, Morrow JD. 1994.** Actions of the E2-isoprostane, 8-ISO-PGE<sub>2</sub>, on the platelet thromboxane/endoperoxide receptor in humans and rats: additional evidence for the existence of a unique isoprostane receptor. *Prostaglandins* **48**: 247-256.
- Lopatkin NA, Iarmolinskii IS. 1994.** [An optimal method for using cyclosporin in the transplantation of cadaveric kidney]. *Urol.Nefrol.(Mosk)* 35-37.
- Lopes AA, Silveira MA, Martinelli RP, Rocha H. 2001.** [Association between race and incidence of end-stage renal disease secondary to glomerulonephritis: influence of the histologic type and presence of arterial hypertension]. *Rev.Assoc.Med.Bras.* **47**: 78-84.
- Lorber MI. 1989.** The mechanism of cyclosporin immunosuppression. *Year Immunol.* **4**: 253-263.
- Lorre K, Fransen L, Ceuppens JL. 1992.** Interleukin-2 induces tumor necrosis factor-alpha production by activated human T cells via a cyclosporin-sensitive pathway. *Eur.Cytokine Netw.* **3**: 321-330.
- Lundgren G, Groth CG, Albrechtsen D, Brynger H, Flatmark A, Frodin L, Gabel H, Husberg B, Klintmalm G, Maurer W, . 1986.** HLA-matching and pretransplant blood transfusions in cadaveric renal transplantation--a changing picture with cyclosporin. *Lancet* **2**: 66-69.
- Luscher TF, Yang Z, Diederich D, Buhler FR. 1989.** Endothelium-dependent vascular responses: effect of hypertension and cyclosporin A. *Z.Kardiol.* **78 Suppl 6**: 132-136.
- Lustig S, Stern N, Golub MS, Eggena P, Barrett J, Lee DB. 1989.** Experimental cyclosporin hypertension: characterization of the rat model. *Transplant.Proc.* **21**: 950-951.
- Mackay et al. 2000.** The HLA-System. *NEJM.* **343**: 702-9.
- Magae J, Matsubara H, Aotsuka N, Kurasawa K, Shearer GM. 1996.** Interleukin-2 does not overcome suppression of graft rejection by cyclosporin A: effect of cyclosporin A on T cell properties in vivo. *Cell Immunol.* **173**: 276-281.
- Maguire S, Kyne F, UaConaill D. 1987.** An improved extraction procedure for an HPLC method for cyclosporin A in whole blood and plasma. *Ann.Clin.Biochem.* **24 ( Pt 2)**: 161-166.
- Mai I, Kruger H, Budde K, John A, Brockmoller J, Neumayer HH, Roots I. 2000.** Hazardous pharmacokinetic interaction of Saint John's wort (*Hypericum perforatum*) with the immunosuppressant cyclosporin. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.* **38**: 500-502.
- Makowka L, Lopatin W, Gilas T, Falk J, Phillips MJ, Falk R. 1986.** Prevention of cyclosporine (CyA) nephrotoxicity by synthetic prostaglandins. *Clin.Nephrol.* **25 Suppl 1**: S89-S94.
- Malingre MM, Beijnen JH, Rosing H, Koopman FJ, van Tellingen O, Duchin K, Bokkel Huinink WW, Swart M, Lieverst J, Schellens JH. 2001.** A phase I and pharmacokinetic study of bi-daily dosing of oral paclitaxel in combination with cyclosporin A. *Cancer Chemother.Pharmacol.* **47**: 347-354.
- Marsh CL. 1999.** Abbreviated pharmacokinetic profiles in area-under-the-curve monitoring of cyclosporine therapy in de novo renal transplant patients treated with Sandimmune or Neoral. Neoral study group. *Ther.Drug Monit.* **21**: 27-34.
- Martin A, Wong KS, Li M, Turner SW, Whitworth JA. 1994.** Cyclosporin hypertension in the Wistar rat: role of uninephrectomy. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **21**: 287-292.
- Masri MA, Barbari A, Stephan A, Kamel G, Frem G, Younan F, Rizk S, Moubarak R, Karam A. 1996.** Cyclosporine pharmacokinetics in stable renal transplant patients: effect of formulation Sandimmun versus Consupren versus Neoral. *Transplant.Proc.* **28**: 1318-1320.



- Masri MA, Barbari A, Stephan A, Kamel G, Aoun S, Rizk S, Karam A. 1999.** Safe and cost effective conversion from Neoral to Consupren soft gelatin capsules in stable renal transplant patients: a 1-year study. *Transplant.Proc.* **31**: 3302-3303.
- Mayer RD, Berman S, Cockett AT, Maines MD. 1989.** Differential effects of cyclosporin on hepatic and renal heme, cytochrome P-450 and drug metabolism. Possible role in nephrotoxicity of the drug. *Biochem.Pharmacol.* **38**: 1001-1007.
- Mazzara R, Pereira A, Vilardell J, Andreu J, Ricart MJ, Castillo R. 1988.** 'AUTO'-anti-ABO antibodies after organ transplantation: a ciclosporin A related phenomenon? *Vox Sang.* **55**: 246.
- McAuley FT, Simpson JG, Thomson AW, Whiting PH. 1987.** Cyclosporin A-induced nephrotoxicity in the rat: relationship to increased plasma renin activity. *Agents Actions* **21**: 209-216.
- McNally PG, Feehally J, Walls J. 1991.** Diabetes, cyclosporin nephrotoxicity, and serum creatinine concentration. *Diabet.Med.* **8**: 289.
- McNally PG, Feehally J. 1992.** Pathophysiology of cyclosporin A nephrotoxicity: experimental and clinical observations. *Nephrol.Dial.Transplant.* **7**: 791-804.
- Mead JC, Brown PA, Whiting PH. 1994.** The relationship between total kidney cyclosporin A concentrations, trough drug levels and renal function in the rat following withdrawal of treatment. *Hum.Exp.Toxicol.* **13**: 506-511.
- Meier-Kriesche HU, Kaplan B, Brannan P, Kahan BD, Portman RJ. 1998.** A limited sampling strategy for the estimation of eight-hour neoral areas under the curve in renal transplantation. *Ther.Drug Monit.* **20**: 401-407.
- Meier-Kriesche HU, Alloway R, Gaber AO, Canafax DM, Kaplan B. 1999.** A limited sampling strategy for the estimation of 12-hour SangCya and neoral AUCs in renal transplant recipients. *J.Clin.Pharmacol.* **39**: 166-171.
- Mendez R, Abboud H, Burdick J, Copley B, Freeman R, Batiuk TD, Cooney GF, Barbeito R. 1999.** Reduced inpatient variability of cyclosporine pharmacokinetics in renal transplant recipients switched from oral Sandimmune to Neoral. *Clin.Ther.* **21**: 160-171.
- Mervaala EM, Teravainen TL, Pere AK, Lindgren L, Laakso J, Karjala K, Vapaatalo H, Ahonen J, Karppanen H. 1996.** Dietary salt aggravates cyclosporin A-induced hypertension and nephrotoxicity in spontaneously hypertensive rats: protection by oral magnesium supplementation. *Contrib.Nephrol.* **119**: 121-124.
- Mihatsch MJ, Thiel G, Ryffel B. 1986.** Morphology of ciclosporin nephropathy. *Prog.Allergy* **38**: 447-465.
- Mihatsch MJ, Thiel G, Ryffel B. 1986.** Brief review of the morphology of ciclosporin nephropathy. *Contrib.Nephrol.* **51**: 156-161.
- Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F. 1995.** The differential diagnosis between rejection and cyclosporine toxicity. *KidneyInt.* **S52**: S63-69.
- Mikol V, Kallen J, Walkinshaw MD. 1994.** X-ray structure of a cyclophilin B/cyclosporin complex: comparison with cyclophilin A and delineation of its calcineurin-binding domain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**: 5183-5186.
- Miller et al. 1962.** Kidney Transplantation in the Rat. *Nature.* **194**: 309-10.
- Minuz P, Andrioli G, Degan M, Gaino S, Ortolani R, Tommasoli R, Zuliani V, Lechi A, Lechi C. 1998.** The F2-isoprostane 8-epiprostaglandin F2alpha increases platelet adhesion and reduces the antiadhesive and antiaggregatory effects of NO. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **18**: 1248-1256.
- Moia LJ, Matsui H, de Barros GA, Tomizawa K, Miyamoto K, Kuwata Y, Tokuda M, Itano T, Hatase O. 1994.** Immunosuppressants and calcineurin inhibitors, cyclosporin A and FK506, reversibly inhibit epileptogenesis in amygdaloid kindled rat. *Brain Res.* **648**: 337-341.
- Morales JM, Andres A, Rengel M, Rodicio JL. 2001.** Influence of cyclosporin, tacrolimus and rapamycin on renal function and arterial hypertension after renal transplantation. *Nephrol.Dial.Transplant.* **16 Suppl 1**: 121-124.

- Morris-Stiff G, Singh J, Ostrowski K, Balaji V, Moore R, Darby C, Lord R, Jurewicz WA. 1998.** Prospective randomized study comparing FK 506 (Prograf) and cyclosporine A (Neoral) as primary immunosuppression in cadaveric renal transplants at a single institution: interim report of the first 80 cases. *Transplant.Proc.* **30**: 1295-1296.
- Morris PJ. 2001.** Kidney Transplantation: Principles and Practice 5<sup>th</sup> Edition. *WB Saunders Company*.
- Morris RG. 2000.** Cyclosporin assays, metabolite cross-reactivity, and pharmacokinetic monitoring. *Ther.Drug Monit.* **22**: 160-162.
- Morrow JD, Minton TA, Roberts LJ. 1992.** The F2-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist. *Prostaglandins* **44**: 155-163.
- Mraz W, Muller C, Molnar B, Knedel M. 1989.** Analysis of cyclosporin A (CsA) concentrations by fluorescence polarization immunoassay (FPIA): comparison with radio immunoassay (RIA) and liquid chromatography (HPLC). *Transplant.Proc.* **21**: 885-887.
- Nahman NS, Jr., Cosio FG. 1990.** The effects of ciclosporin in experimental glomerulosclerosis. *Nephron* **56**: 414-420.
- Natarajan et al. 1999.** MHC Class I molecules, structures and function. *Rev.Immunogen.* **1**: 32-46.
- Neild GH. 1988.** Vasodilatory prostaglandins and cyclosporin nephrotoxicity. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* **33**: 207-212.
- Neild GH. 1990.** Cyclosporin nephrotoxicity. *Semin.Thorac.Cardiovasc.Surg.* **2**: 198-203.
- Nelson PA, Akselband Y, Kawamura A, Su M, Tung RD, Rich DH, Kishore V, Rosborough SL, DeCenzo MT, Livingston DJ, . 1993.** Immunosuppressive activity of [MeBm2t]1-, D-diaminobutyl-8-, and D-diaminopropyl-8-cyclosporin analogues correlates with inhibition of calcineurin phosphatase activity. *J.Immunol.* **150**: 2139-2147.
- Nieszporek T, Grzeszczak W, Kokot F, Zukowska-Szczechowska E . 1989.** [Adrenal cortex function in patients after kidney transplantation treated with cyclosporin A with prednisone or Azathioprine with prednisone]. *Pol.Arch.Med.Wewn.* **81**: 86-91.
- Nishi Y. 2001.** [Neoral (Cyclosporin microemulsion preconcentrate): pharmacokinetics, pharmacodynamics and its improved clinical outcome]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **118**: 107-115.
- Noble S, Markham A. 1995.** Cyclosporin. A review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (Neoral). *Drugs* **50**: 924-941.
- O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA. 1992.** FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* **357**: 692-694.
- Ockner SA, Guttman RD, Lindquist RR. 1970.** Renal transplantation in the inbred rat. XIV. Mechanism of the modified rejection produced by bone marrow cell pretreatment. *Transplantation* **9**: 39-48.
- Ockner SA, Guttman RD, Lindquist RR. 1970.** Renal transplantation in the inbred rat. 13. Modification of rejection by active immunization with bone marrow cells. *Transplantation* **9**: 30-38.
- Oiwa K, Sakagami K, Orita K. 1989.** Effects of anti-interleukin-2 receptor antibody and cyclosporin A on human T cell proliferation in primary mixed lymphocyte reaction. *Hiroshima J.Med.Sci.* **38**: 1-6.
- Oldhafer K, Haller GW, Kattner A, Winkler M, Maibucher A, Farber L, Bechstein WO, Ringe B, Neuhaus P, Pichlmayr R. 1996.** Absorption of cyclosporine Neoral early after liver transplantation: influence of bile on oral absorption. *Transplant.Proc.* **28**: 2237-2238.

**Oliveira JG, Ramos JP, Xavier P, Sampaio S, Magalhaes MC, Mendes AA, Pestana M. 2001.** Microemulsion cyclosporin formulation, in contrast to the old formulation, widens the T lymphocyte subsets differences between stable and acute rejection of kidney transplants. *Nephrol.Dial.Transplant.* **16**: 1256-1261.

**Opelz et al. 2001.** *CTS Newsletter.* **1**: 1-11.

**Ozdemir BH, Bilezikci B, Haberal AN, Demirhan B, Gungen Y. 2000.** Histologic evaluation, HLA-DR expression, and macrophage density of renal biopsies in OKT3-treated acute rejection: comparison with steroid response in acute rejection. *Transplant.Proc.* **32**: 528-531.

**Pak K, Tomoyoshi T, Nomura Y, Okabe T. 1987.** [Studies on nephrotoxicity of cyclosporin. 1. Nephrotoxicity in rats receiving cyclosporin]. *Hinyokika Kiyo* **33**: 1966-1974.

**Papachristou F, Gakis D, Sotiriou I, Liatsis I, Takoudas D, Antoniadis A. 1998.** Pharmacokinetic study of twice vs thrice daily dosing of Sandimmun Neoral in pediatric renal transplant patients. *Transplant.Proc.* **30**: 1988-1990.

**Patrignani P, Panara MR, Tacconelli S, Seta F, Bucciarelli T, Ciabattoni G, Alessandrini P, Mezzetti A, Santini G, Sciulli MG, Cipollone F, Davi G, Gallina P, Bon GB, Patrono C. 2000.** Effects of vitamin E supplementation on F(2)-isoprostane and thromboxane biosynthesis in healthy cigarette smokers. *Circulation* **102**: 539-545.

**Patrono C, FitzGerald GA. 1997.** Isoprostanes: Potential Markers of Oxidant Stress in Atherothrombotic Disease. *Art.Thro.Vasc.Biol* **17**: 2309-2315.

**Pawelec G, Wernet P. 1983.** Cyclosporin A inhibits interleukin 2-dependent growth of alloactivated cloned human T-lymphocytes. *Int.J.Immunopharmacol.* **5**: 315-321.

**Perico N, Zoja C, Benigni A, Bosco E, Rossini M, Morelli C, Cattaneo GM, Remuzzi G. 1986.** Renin-angiotensin system and glomerular prostaglandins in early nephrotoxicity of cyclosporin. *Contrib.Nephrol.* **51**: 120-125.

**Persijn GG et al. 2001.** Three-year Experience with the New Eurotransplant Kidney Allocation System. *Transplant.Proceed.* **33**: 821-80.

**Pescovitz MD, Henson S, Bodziak K, Book BK, Gonin J, Jindal RM, Leapman SB, Milgrom ML, Filo RS. 1996.** Pharmacokinetic analysis of Neoral conversion in pediatric and adult renal transplant recipients with poor absorption of Sandimmune. *Transplant.Proc.* **28**: 2165-2168.

**Pescovitz MD, Wong RL, Choc MG, Chang CT. 1997.** Equivalence of cyclosporine blood level assays in patients receiving cyclosporine microemulsion or cyclosporine. The Sandoz Neoral Study Group N103. *Clin.Transplant.* **11**: 442-445.

**Peters D, Tsuchida M, Manthei ER, Alam T, Cho CS, Knechtle SJ, Hamawy MM. 2000.** Potentiation of CD3-induced expression of the linker for activation of T cells (LAT) by the calcineurin inhibitors cyclosporin A and FK506. *Blood* **95**: 2733-2741.

**Phillips PA, Rolls KA, Burrell LM, Casley D, Aldred KL, Hardy KJ. 1994.** Vascular endothelin responsiveness and receptor characteristics in vitro and effects of endothelin receptor blockade in vivo in cyclosporin hypertension. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **21**: 223-226.

**Pichlmayr R, Wonigeit K, Klempnauer J, Ringe B, Bunzendahl H, Kreller H, Heigel B, Siegismund S. 1985.** Experience with cyclosporin/prednisolone therapy in kidney transplantation, with special reference to nephrotoxicity, ATN and kidney preservation. *Neth.J.Med.* **28**: 268-271.

**Portman RJ, Meier-Kriesche HU, Swinford R, Brannan P, Kahan BD. 2000.** Reduced variability of neoral pharmacokinetic studies in pediatric renal transplantation. *Pediatr.Nephrol.* **15**: 2-6.

**Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. 1994.** Cyclooxygenase-dependent formation of the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **744**: 139-145.

- Prischl F, Gremmel F, Schwabe M, Schindler J, Balcke P, Kopsa H, Pinter G, Schwarzmeier J, Zazgornik J. 1989.** Beta-2-microglobulin for differentiation between ciclosporin A nephrotoxicity and graft rejection in renal transplant recipients. *Nephron* **51**: 330-337.
- Puschett JB, Greenberg A, Holley J, McCauley J. 1990.** The spectrum of ciclosporin nephrotoxicity. *Am.J.Nephrol.* **10**: 296-309.
- Pyrzynska B, Lis A, Mosieniak G, Kaminska B. 2001.** Cyclosporin A-sensitive signaling pathway involving calcineurin regulates survival of reactive astrocytes. *Neurochem.Int.* **38**: 409-415.
- Quarto dP, Palazzi P, Vazzola A, Scabini M, Vezzoli G, Elli A, Bianchi G. 1986.** Acute tubular necrosis and arterial hypertension in renal transplant patients treated with ciclosporin. *Contrib.Nephrol.* **51** : 133-136.
- Radeke HH et al., 1991.** Additive and synergistic effects of cyclosporine metabolites on glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* **39**: 1255-66.
- Radermacher J, Meiners M, Bramlage C, Kliem V, Behrend M, Schlitt HJ, Pichlmayr R, Koch KM, Brunkhorst R. 1998.** Pronounced renal vasoconstriction and systemic hypertension in renal transplant patients treated with cyclosporin A versus FK 506. *Transpl.Int.* **11**: 3-10.
- Ramirez C, Olmo A, O'Valle F, Masseroli M, Aguilar M, Gomez-Morales M, Revelles F, Garcia-Chicano MJ, Arrebola F, Reguero ME, del Moral RG. 2000.** Role of intrarenal endothelin 1, endothelin 3, and angiotensin II expression in chronic cyclosporin A nephrotoxicity in rats. *Exp.Nephrol.* **8**: 161-172.
- Randak C, Brabletz T, Hergenrother M, Sobotta I, Serfling E. 1990.** Cyclosporin A suppresses the expression of the interleukin 2 gene by inhibiting the binding of lymphocyte-specific factors to the IL-2 enhancer. *EMBO J.* **9**: 2529-2536.
- Rao KV, Crosson JT, Kjellstrand CM. 1985.** Chronic irreversible nephrotoxicity from cyclosporin A. *Nephron* **41**: 75-77.
- Reed JC, Abidi AH, Alpers JD, Hoover RG, Robb RJ, Nowell PC. 1986.** Effect of cyclosporin A and dexamethasone on interleukin 2 receptor gene expression. *J.Immunol.* **137**: 150-154.
- Reggiani P, Rossi G, Latham L, Caccamo L, Gatti S, Maggi U, Melada E, Paone G, Doglia M, Vannelli A, Fassati LR. 1998.** Reduced acute rejection after liver transplantation with Neoral-based double immunosuppression. *Transplant.Proc.* **30**: 1855-1856.
- Rettig R et al., 1994.** Effects of kidney transplantation on the renin-angiotensin systems of the recipients. *KidneyInt.* **46**: 1536-1538.
- Richter A, Davies DE, Alexander P. 1995.** Growth inhibitory effects of FK506 and cyclosporin A independent of inhibition of calcineurin. *Biochem.Pharmacol.* **49**: 367-373.
- Riegel W, Stephan E, Balle C, Schollmeyer P, Heidland A, Horl WH. 1989.** Effect of cyclosporin A on carbohydrate metabolism of isolated rat liver cells. *Kidney Int.Suppl* **27**: S236-S238.
- Ritschel WA. 1996.** Microemulsion technology in the reformulation of cyclosporine: the reason behind the pharmacokinetic properties of Neoral. *Clin.Transplant.* **10**: 364-373.
- Roberts HC, Sternberg JM, Chappell LH. 1997.** Characterization of calcineurin from *Hymenolepis microstoma* and *H. diminuta* and its interaction with cyclosporin A. *Parasitology* **114 ( Pt 3)**: 279-283.
- Roberts LJ, Moore KP, Zackert WE, Oates JA, Morrow JD. 1996.** Identification of the major urinary metabolite of the F2-isoprostane 8- iso-prostaglandin F2alpha in humans. *J.Biol.Chem.* **271**: 20617-20620.
- Roberts LJ, Brame CJ, Chen Y, Morrow JD, Salomon RG. 1999.** Formation of reactive products of the isoprostane pathway: isolevuglandins and cyclopentenone isoprostanes. *Adv.Exp.Med.Biol.* **469**: 335-341.

- Roberts NB, Dutton J, Tewari A, Bone MJ, Sells RA, Ward RG, West CR. 1995.** A method of relating whole blood cyclosporin A results by HPLC to Abbott TDx monoclonal and polyclonal immunoassays. *Ann.Clin.Biochem.* **32 ( Pt 2):** 208-209.
- Rolls KA, Phillips PA, Aldred K, Hardy KJ. 1994.** Vasoconstrictor responses to components of the renin-angiotensin system in cyclosporin-induced hypertension in the rat. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **21:** 227-230.
- Ross N, English J, Bennett WM. 1988.** Effect of animal sex on experimental cyclosporin nephrotoxicity. *Nephron* **48:** 58-60.
- Roullet JB, Xue H, McCarron DA, Holcomb S, Bennett WM. 1994.** Vascular mechanisms of cyclosporin-induced hypertension in the rat. *J.Clin.Invest* **93:** 2244-2250.
- Sabbatini M, De Nicola L, Uccello F, Russo D, Conte G, Dal Canton A, Andreucci VE. 1990.** Absence of acute nephrotoxicity with low doses of cyclosporin: experimental study in the rat. *Nephrol.Dial.Transplant.* **5:** 69-74.
- Sacchi G, Benetti A, Falchetti M, Grigolato P, Cristinelli L, Strada A, Maiorca R. 1987.** Ultrastructural renal findings in allografted kidneys of patients treated with cyclosporin A. *Appl.Pathol.* **5:** 101-107.
- Sadeg N, Pham HC, Martin C, Warnet JM, Claude JR. 1993.** Effect of cyclosporin A and its metabolites and analogs on lipid peroxidation in rabbit renal microsomes. *Drug Chem.Toxicol.* **16:** 165-174.
- Safarik K, Brozmanova H, Bartos V, Jegorov A, Grundmann M. 2001.** Evaluation and comparison of therapeutic monitoring of whole-blood levels of cyclosporin A and its metabolites in renal transplantation by HPLC and RIA methods. *Clin.Chim.Acta* **310:** 165-171.
- Salahudeen A, Badr K, Morrow J, Roberts J. 1995.** Hydrogen peroxide induces 21-aminosteroid-inhibitable F2-isoprostane production and cytolysis in renal tubular epithelial cells. *J.Am.Soc.Nephrol.* **6:** 1300-1303.
- Salahudeen A, Nawaz M, Poovala V, Kanji V, Wang C, Morrow J, Roberts J. 1999.** Cold storage induces time-dependent F2-isoprostane formation in renal tubular cells and rat kidneys. *Kidney Int.* **55:** 1759-1762.
- Sarabi M, Vessby B, Basu S, and J, Lind L. 1999.** Relationships between endothelium-dependent vasodilation, serum vitamin E and plasma isoprostane 8-iso-PGF(2alpha) levels in healthy subjects. *J.Vasc.Res.* **36:** 486-491.
- Savoldi S, Scolari F, Sandrini S, Prati E, Scaini P, Cristinelli L, Maiorca R. 1986.** Cyclosporin in renal transplantation: identification of two populations with different drug metabolism. *Contrib.Nephrol.* **51:** 31-38.
- Schehader et al. 1970.** Renal Transplantation in the inbred Rat. *Transplantation.* **10:** 66-74.
- Schrama YC, Koomans HA. 1998.** Interactions of cyclosporin A and amlodipine: blood cyclosporin A levels, hypertension and kidney function. *J.Hypertens.Suppl* **16:** S33-S38.
- Schroeder TJ, Cho MJ, Pollack GM, Floc'h R, Moran HB, Levy R, Moore LW, Pouletty P. 1998.** Comparison of two cyclosporine formulations in healthy volunteers: bioequivalence of the new Sang-35 formulation and Neoral. *J.Clin.Pharmacol.* **38:** 807-814.
- Schultz KR, Nevill TJ, Balshaw RF, Toze CL, Corr T, Currie CJ, Strong DK, Keown PA. 2000.** Effect of gastrointestinal inflammation and age on the pharmacokinetics of oral microemulsion cyclosporin A in the first month after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **26:** 545-551.
- Schumann G, Petersen D, Hoyer PF, Wonigeit K. 1993.** Monitoring cyclosporin A (cyclosporin, INN) concentrations in whole blood: evaluation of the EMIT assay in comparison with HPLC and RIA. *Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* **31:** 381-388.
- Schwaninger M, Blume R, Oetjen E, Knepel W. 1993.** The immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506 inhibit calcineurin phosphatase activity and gene transcription mediated through the cAMP- responsive element in a nonimmune cell line. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **348:** 541-545.

- Serafinowicz A, Gaciong Z, Baczkowska T, Durlík M, Lao M. 1996.** Cyclosporine pharmacokinetics in renal allograft recipients with diabetes mellitus with Sandimmune and Sandimmune Neoral. *Transplant.Proc.* **28**: 3140-3141.
- Serre-Debeauvais F, Benzekri S, Alix JL, Vialtel P, Gavend M. 1988.** [Blood pharmacokinetic parameters of cyclosporin A and nephrotoxicity. Diagnostic and predictive value in renal transplantation]. *Therapie* **43**: 9-13.
- Sewing KF, Christians U, Bleck JS, Schottmann R, Strohmeyer SS. 1988.** Measurement and disposition of ciclosporin and its metabolites. *Bibl.Cardiol.* 63-72.
- Shaheen FA, Sheikh IA, al Khader A. 1998.** Cyclosporin Neoral and long-term survival of renal grafts. *Transplant.Proc.* **30**: 3549.
- Shapiro R et al. 1998.** Renal Transplantation 1<sup>st</sup> Edition. *Prentice Hall*.
- Shaw LM et al. 1987.** Clinical issues in cyclosporin monitoring: report of the task force on cyclosporine monitoring. total. *Clin.Chem.* **33**: 1269-88.
- Shehadeh IH, Guttman RD, Lindquist RR, Rodriguez-Erdmann F. 1970.** Renal transplantation in the inbred rat. XVI. Effects of salicylates and anticoagulant drugs on rejection. *Transplantation* **10**: 75-85.
- Shibata et al. 1999.** Influence of Glycerol-induced acute renal Failure on the Pharmacokinetics of Cyclosporin in Rats. *J.Pharm.Pharmacol.* **51**: 397-404.
- Shoskes DA, Webster R, Shahed A. 2000.** Oxidant stress in cadaveric and living kidney donors as markers of renal injury: utility of total antioxidant capacity and isoprostane levels in urine. *Transplant.Proc.* **32**: 804-805.
- Shimizu A et al. 2000.** Rejection of peritubular capillaries in renal allo- and xeno-graft. *Clin.Transplant.* **S14**: 6-14
- Simon N, Barre J, Jolliet P, Urien S, Tillement JP. 1997.** [Mediators involved in the nephrotoxicity of cyclosporin A]. *Therapie* **52**: 329-333.
- Solez K et al., . 1993.** International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *KidneyInt.* **44**: 411-422.
- Steimer W. 1998.** Evaluation of the AxSYM CyA assay compared with HPLC, TDx monoclonal and EMIT with both pretreatments. *Transplant.Proc.* **30**: 4045-4047.
- Stockenhuber F, Gottsauner-Wolf M, Marosi L, Liebisch B, Kurz RW, Balcke P. 1992.** Plasma levels of endothelin in chronic renal failure and after renal transplantation: impact on hypertension and cyclosporin A-associated nephrotoxicity. *Clin.Sci.(Colch.)* **82**: 255-258.
- Sturrock ND, Lang CC, Struthers AD. 1992.** Cyclosporin-induced nephrotoxicity and hypertension. *Br.J.Hosp.Med.* **48**: 483-489.
- Sturrock ND, Struthers AD. 1994.** Hormonal and other mechanisms involved in the pathogenesis of cyclosporin-induced nephrotoxicity and hypertension in man. *Clin.Sci.(Colch.)* **86**: 1-9.
- Su Q, Weber L, Le Hir M, Zenke G, Ryffel B. 1995.** Nephrotoxicity of cyclosporin A and FK506: inhibition of calcineurin phosphatase. *Ren Physiol Biochem.* **18**: 128-139.
- Swanson SK, Born T, Zydowsky LD, Cho H, Chang HY, Walsh CT, Rusnak F. 1992.** Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**: 3741-3745.
- Taesch S, Niese D, Mueller EA. 1994.** Sandimmun neoral, a new oral formulation of cyclosporin A with improved pharmacokinetic characteristics: safety and tolerability in renal transplant patients. *Transplant.Proc.* **26**: 3147-3149.
- Takahara S, Ohta K, Ohashi Y, Namii Y, Uchida K, Okuyama A, Kainuma H, Takagi H, Takahashi K, Morikawa H. 2001.** Comparative pharmacokinetic study of neoral versus Sandimmun in Japanese stable renal allograft recipients. *Transplant.Proc.* **33**: 2541-2544.

- Taler SJ, Textor SC, Canzanello VJ, Schwartz L. 1999.** Cyclosporin-induced hypertension: incidence, pathogenesis and management. *Drug Saf* **20**: 437-449.
- Tamura K. 1998.** [Multiple actions of tacrolimus and cyclosporin A as specific inhibitors of calcineurin]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **43**: 1118-1130.
- Tang AW, Walker RG, Nicholls KM, Becker GJ. 2001.** Sirolimus does not potentiate indices of chronic cyclosporin nephrotoxicity. *Transplant.Proc.* **33**: 1061-1063.
- Tariq M, Morais C, Sobki S, Al Sulaiman M, al Khader A. 1999.** N-acetylcysteine attenuates cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephrol.Dial.Transplant.* **14**: 923-929.
- Tataranni G, Zavagli G, Farinelli R, Malacarne F, Fiocchi O, Nunzi L, Scaramuzza P, Scorrano R. 1992.** Usefulness of the assessment of urinary enzymes and microproteins in monitoring ciclosporin nephrotoxicity. *Nephron* **60**: 314-318.
- Taube DH, Neild GH, Williams DG, Cameron JS, Hartley B, Ogg CS, Rudge CJ, Welsh KI. 1985.** Differentiation between allograft rejection and cyclosporin nephrotoxicity in renal-transplant recipients. *Lancet* **2**: 171-174.
- Taylor RM. 1997.** Reexamining the Definition and Criteria of Death. *Semin.Neurol.* **17**: 265-70.
- Tejani A. 1998.** Neoral: the microemulsion formulation. *Pediatr.Transplant.* **2**: 85-86.
- Tenjarla S. 1999.** Microemulsions: An Overview and Pharmaceutical Application. *Cri.Rev.Ther.Drug.Car.Sys.* **16**: 461-521.
- Tjia JF, Webber IR, Back DJ. 1991.** Cyclosporin metabolism by the gastrointestinal mucosa. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **31**: 344-346.
- Toffoli G, Corona G, Sorio R, Bertola A, Boiocchi M. 1997.** Reversal activity of cyclosporin A and its metabolites M1, M17 and M21 in multidrug-resistant cells. *Int.J.Cancer* **71** : 900-906.
- Trull AK, Tan KK, Roberts NB, Tjia JF, Back DJ. 1989.** Cyclosporin metabolites and neurotoxicity. *Lancet* **2**: 448.
- Trull AK, Tan KK, Tan L, Alexander GJ, Jamieson NV. 1994.** Enhanced absorption of new oral cyclosporin microemulsion formulation, Neoral, in liver transplant recipients with external biliary diversion. *Transplant.Proc.* **26**: 2977-2978.
- Ueda CT, Lemaire M, Misslin P. 1983.** Pharmacokinetic evaluation of the blood-to-lymph transfer of cyclosporin A in rats. *Biopharm.Drug Dispos.* **4** : 83-94.
- Vathsala A, Lee WT, Jacob E, Woo KT. 1996.** Cyclosporine pharmacokinetic profiles in stable renal allograft recipients converting from Sandimmun to Neoral. *Transplant.Proc.* **28**: 1324-1326.
- Veremis SA, Maddux MS, Tang IY, Millner SN, Prasad R, Pollak R, Mozes MF. 1989.** Comparison of cyclosporine (CSA) blood levels and RIA/HPLC ratios among renal transplant patients with normal allograft function, CSA nephrotoxicity or rejection. *Transplant.Proc.* **21**: 1476-1477.
- von Graffenried B. 1986.** Cyclosporin in auto-immune diseases. Overview. *Prog.Allergy* **38**: 432-435.
- von Wartburg A, Traber R. 1986.** Chemistry of the natural cyclosporin metabolites. *Prog.Allergy* **38**: 28-45.
- Vonderscher J, Meinzer A. 1994.** Rationale for the development of Sandimmune Neoral. *Transplant.Proc.* **26**: 2925-2927.
- Wallemacq PE, Lhoest G, Latinne D, De Bruyere M. 1989.** Isolation, characterization and in vitro activity of human cyclosporin A metabolites. *Transplant.Proc.* **21**: 906-910.

- Wallemacq PE, Lhoest G, Dumont P. 1989.** Isolation, purification and structure elucidation of cyclosporin A metabolites in rabbit and man. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **18**: 48-56.
- Waller JR, Nicholson ML. 2001.** Molecular mechanism of renal allograft fibrosis. *Brit. J. Surg.* **88**: 1429-41.
- Wang JH, Desai R. 1976.** A brain protein and its effect on the Ca<sup>2+</sup> and protein modulator activated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **72**: 926-932.
- Wang XH, Tang XD, Xu D. 2001.** Sparse-sampling algorithms and C2 monitoring are beneficial to optimize clinical outcomes for neoral. *Transplant. Proc.* **33**: 1059-1060.
- Warrens AN, Salama A, Waters JB, Lechler RI. 1996.** Comparison of Neoral and Sandimmune preparations in renal transplant patients--improved pharmacokinetics with neoral. *Transplant. Proc.* **28**: 2169-2170.
- Webber IR, Peters WH, Back DJ. 1992.** Cyclosporin metabolism by human gastrointestinal mucosal microsomes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **33**: 661-664.
- Wenger RM et al. 1990.** Pharmacology of cyclosporin (sandimmune). II. Chemistry. *Pharmacol. Rev.* **41**: 243-7.
- Whiting PH, Thomson AW, Blair JT, Simpson JG. 1982.** Experimental cyclosporin A nephrotoxicity. *Br. J. Exp. Pathol.* **63**: 88-94.
- Whiting PH. 1990.** Mechanisms underlying cyclosporin A nephrotoxicity. *Toxicol. Lett.* **53**: 69-73.
- Woerly G, Weber E, Ryffel B. 1994.** Demonstration of ternary immunophilin-calcineurin complexes with the immunosuppressants cyclosporin and macrolide FK506. *Biochem. Pharmacol.* **47**: 1435-1443.
- Woo KT, Vathsala A, Chiang GS. 1991.** Acute cyclosporin A induced nephrotoxicity in renal allografts. *Ann. Acad. Med. Singapore* **20**: 403-406.
- Yilmaz S, Taskinen E, Paavonen T, Mennander A, Hayry P. 1992.** Chronic rejection of rat renal allograft. I. Histological differentiation between chronic rejection and cyclosporin nephrotoxicity. *Transpl. Int.* **5**: 85-95.
- Yoshimura N, Oka T, Amagai T, Horii Y, Imanishi J. 1991.** Interleukin-2 receptor gene expression in kidney transplant recipients treated with cyclosporin A. *Clin. Exp. Immunol.* **85**: 326-330.
- Yura T, Fukunaga M, Grygorczyk R, Makita N, Takahashi K, Badr KF. 1995.** Molecular and functional evidence for the distinct nature of F2- isoprostane receptors from those of thromboxane A<sub>2</sub>. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* **23**: 237-239.
- Yura T, Fukunaga M, Khan R, Nassar GN, Badr KF, Montero A. 1999.** Free-radical-generated F2-isoprostane stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney Int.* **56**: 471-478.



---

## 11 Anhang

### 11.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb.01</b>	Statistik der häufigsten Todesursachen in Deutschland. Stand 1995, Eurotransplant.	10
<b>Abb.02</b>	Entwicklung der Warteliste für eine Nierentransplantation im Bereich von Eurotransplant. Stand 1969-1995.	12
<b>Abb.03</b>	Lokalisation des HLA-Komplexes auf Chromosom 6	13
<b>Abb.04</b>	Darstellung der HLA-I und -II Antigene auf einer Zelloberfläche	15
<b>Abb.05</b>	Ribbon Modell der Tertiärstruktur der Peptidbindungsstelle eines HLA-I Moleküls ( <i>Little et al., 1999</i> )	
<b>Abb.06</b>	Darstellung der heterotopen Nierentransplantation in die Fossa iliaca	18
<b>Abb.07</b>	Pseudo-ternäres Phasendiagramm zur schematischen Darstellung der Phasenverteilung einer Emulsion	21
<b>Abb.08</b>	Molekularer Wirkmechanismus des Cyclosporin A	23
<b>Abb.09</b>	Überlebensrate der Nierentransplantate (Leichenspende, 1. TX) von 1998-2000 ( <i>Opelz et al., 2001</i> )	28
<b>Abb.10</b>	Hypothetischer Circulus vitiosus zwischen Nephrotoxizität, Organabstoßung und Metabolismus des Cyclosporin A	29
<b>Abb.11</b>	WKY (links) und BN (rechts) Ratten	31
<b>Abb.12</b>	Ratten OP mit einem laparotomierten Versuchstier ( <i>eigenes Foto</i> )	45
<b>Abb.13</b>	Präparation der Peritonealgefäße	45
<b>Abb.14</b>	Vollständig auf TX vorbereitete Ratte ( <i>eigenes Foto</i> )	46
<b>Abb.15</b>	Spülen der Niere vor der Entnahme	46
<b>Abb.16</b>	Darstellung der orthotopen NierenTX mit end-to-end Anastomosen ( <i>Timmermann, 1998</i> )	46
<b>Abb.17</b>	Anlegen des Approximators und Unterlage einer Plastikfolie zur Verbesserung der Sicht ( <i>Mehdorn, 1987; eigenes Foto</i> )	47
<b>Abb.18</b>	Entfernen der Adventitia und Irrigation der Gefäßstümpfe ( <i>Mehdorn, 1987</i> )	48
<b>Abb.19</b>	Beginn der arteriellen Anastomose mit 2 Fixierknoten. Komplette Anastomose hiermit 8 Knoten dargestellt ( <i>Mehdorn, 1987</i> )	48
<b>Abb.20</b>	Erfolgreiche Anastomosen der A. und V. renalis ( <i>eigenes Foto</i> )	49
<b>Abb.21</b>	Standardchromatogramm des Metabolitenmixes bei isokratischer Elution	57
<b>Abb.22</b>	Chromatogramm einer Nierenprobe einer Ratte nach 6 Wochen Sandimmun Neoral®	57
<b>Abb.23</b>	Standardchromatogramm des Metabolitenmixes bei Elution mit einem Stufengradienten	57
<b>Abb.24</b>	Chromatogramm einer humanen Blutprobe eines Patienten nach Nierentransplantation mit Sandimmun Neoral®	57
<b>Abb.25</b>	Struktur des CsA: Darstellung der einzelnen Aminosäuren	60
<b>Abb.26</b>	Schematische Darstellung der Hauptmetabolisierungspunkte des CsA	61
<b>Abb.27</b>	Schema der Genese der wichtigsten Primärmetaboliten des CsA	62
<b>Abb.28</b>	AM1: Hydroxylierung des endständigen C-Atoms der AA1	62
<b>Abb.29</b>	AM1c: wie AM1 (Abb.28), zusätzlich Cyclisierung in der Seitenkette der AA1 zu einem THF Rest	63
<b>Abb.30</b>	AM4N: N-Demethylierung an der AA4	63
<b>Abb.31</b>	AM9: Oxidation einer endständigen Methylgruppe der AA4	64
<b>Abb.32</b>	Darstellung der Dosislinearität des CsA im Vollblut und den Organen im steady-state (n = 6, $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , ★ p < 0.05)	67
<b>Abb.33</b>	Dosisabhängige Bildung von AM4N. Darstellung des Verhältnisses des Gehaltes an AM4N zur CsA Konzentration im Vollblut ((n = 6, $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , ★ p < 0.05)	68

<b>Abb.34</b>	Darstellung der Plasminogenaktivität (PRA) und der Renin mRNA Expression im Nierengewebe bei verschiedenen Dosierungen des CsA (n = 6, x ± SEM, ★ p < 0.05)	69
<b>Abb.35</b>	Darstellung der COX-1 und COX-2 mRNA Expression im Nierengewebe bei verschiedenen Dosierungen des CsA (n = 6, x ± SEM, ★ p < 0.05)	70
<b>Abb.36</b>	Darstellung der mRNA Expression der ET Rezeptoren A und B im Nierengewebe bei verschiedenen Dosierungen des CsA (n = 6, x ± SEM, ★ p < 0.05)	71
<b>Abb.37</b>	Talspiegel des CsA zu Beginn und am Ende der Versuchsreihe nach 6 Wochen im Vollblut aller Versuchstiere (n = 8, x ± SEM, ★ p < 0.05)	73
<b>Abb.38</b>	Talspiegel der CM im Vollblut nach 6 Wochen (n = 8, x ± SEM, ★ p < 0.05)	74
<b>Abb.39</b>	Talspiegel des CsA im Nierengewebe nach 6 Wochen. Aufspaltung in Cortex und Medulla (n = 8, x ± SEM, ★ p < 0.05)	75
<b>Abb.40</b>	Talspiegel der CM im Nierengewebe nach 6 Wochen (n = 8, x ± SEM, ★ p < 0.05)	76
<b>Abb.41</b>	Talspiegel des CsA und der CM im Lebergewebe nach 6 Wochen (n = 8, x ± SEM, ★ p < 0.05)	78
<b>Abb.42</b>	Talspiegel des CsA und der CM im Thymusgewebe nach 6 Wochen (n = 8, x ± SEM, ★ p < 0.05)	80
<b>Abb.43</b>	Talspiegel des CsA und der CM im Milzgewebe nach 6 Wochen (n = 8, x ± SEM, ★ p < 0.05)	82
<b>Abb.44</b>	Ausscheidungsrate des CsA in den 24h Sammelurin nach 1, 3 und 6 Wochen (n = 8, x ± SEM, ★ p < 0.05)	83
<b>Abb.45</b>	Ausscheidungsrate der CM AM1 und AM1c in den 24h Sammelurin nach 1, 3 und 6 Wochen (n = 8, x ± SEM, ★ p < 0.05)	84
<b>Abb.46</b>	Ausscheidungsrate der CM AM4N und AM9 in den 24h Sammelurin nach 1, 3 und 6 Wochen (n = 8, x ± SEM, ★ p < 0.05)	85
<b>Abb.47</b>	Darstellung der Serum Creatininwerte nach 1, 3 und 6 Wochen (n = 8, x ± SEM, ★ p < 0.05)	87
<b>Abb.48</b>	Strukturformeln des PGF <sub>2α</sub> und des 8-epi-PGF <sub>2α</sub> (8-IP)	88
<b>Abb.49</b>	Darstellung der 8-IP Ausscheidungsrate in den 24h Sammelurin nach 1, 3 und 6 Wochen (n = 8, x ± SEM, <b>a, b, c</b> p < 0.05)	89
<b>Abb.50</b>	Erhöhung des systolischen Blutdrucks nach 1, 3 und 6 Wochen (n = 8, x ± SEM, <b>a, b, c</b> p < 0.05)	91
<b>Abb.51</b>	IL-2 Spiegel im Plasma und Nierengewebe nach 6 Wochen (n = 8, x ± SEM, <b>a, b</b> p < 0.05)	93
<b>Abb.52</b>	Übersicht der CsA und CM Talspiegel im Vollblut und in den Organen der unterdosierten Vergleichsgruppen (TXL, NEOL) (n = 5, x ± SEM, <b>a, b, c, d, e, f</b> p < 0.05)	94
<b>Abb.53</b>	Darstellung der SCrea, 8-IP Ausscheidung in den 24h Urin, sowie der IL-2 Plasma und Nierenspiegel der unterdosierten Vergleichsgruppen (TXL, NEOL) (n = 8, x ± SEM, <b>a, b, c</b> p < 0.05)	95
<b>Abb.54</b>	400-fache Vergrößerung der Glomeruli in histologischen Schnitten der Nieren der Transplantationsversuche nach 6 Wochen	96
<b>Abb.55</b>	400-fache Vergrößerung von Arteriolen in histologischen Schnitten der Nieren der Transplantationsversuche nach 6 Wochen	97
<b>Abb.56</b>	Histologische Schnitte der Markzone der Nieren der Transplantationsversuche nach 6 Wochen	98
<b>Abb.57</b>	Änderung der Renin mRNA Expression in den Nieren und der Plasminogenaktivität (PRA) (n = 6, x ± SEM, ★ p < 0.05) nach 6 Wochen	99
<b>Abb.58</b>	Änderung der COX-2 mRNA Expression in den Nierenzonen Cortex, IM und	100

	OM nach 6 Wochen (n = 6, $x \pm \text{SEM}$ , ★ $p < 0.05$ )	
<b>Abb.59</b>	Änderung der COX-1 mRNA Expression in den Nierenzonen Cortex, IM und OM nach 6 Wochen (n = 6, $x \pm \text{SEM}$ , ★ $p < 0.05$ )	101
<b>Abb.60</b>	Änderung der ET-1 mRNA Expression in den Nierenzonen Cortex und OM nach 6 Wochen (n = 6, $x \pm \text{SEM}$ , ★ $p < 0.05$ )	102
<b>Abb.61</b>	Änderung der ET-3 mRNA Expression in den Nierenzonen Cortex und OM nach 6 Wochen (n = 6, $x \pm \text{SEM}$ , ★ $p < 0.05$ )	103
<b>Abb.62</b>	Änderung der ET <sub>A</sub> mRNA Expression in den Nierenzonen Cortex und OM nach 6 Wochen (n = 6, $x \pm \text{SEM}$ , ★ $p < 0.05$ )	104
<b>Abb.63</b>	Änderung der ET <sub>B</sub> mRNA Expression in den Nierenzonen Cortex und OM nach 6 Wochen (n = 6, $x \pm \text{SEM}$ , ★ $p < 0.05$ )	104
<b>Abb.64</b>	Änderung der Genexpressionen der Kollagen-1, -3 und Fibrinogen mRNA in der Niere nach 6 Wochen (n = 6, $x \pm \text{SEM}$ , ★ $p < 0.05$ )	105
<b>Abb.65</b>	Immunohistochemische Färbungen der COX-2 in den Nierenschnitten der Transplantationsversuche nach 6 Wochen	106
<b>Abb.66</b>	Immunohistochemische Färbungen des Renins in den Nierenschnitten der Transplantationsversuche nach 6 Wochen	107
<b>Abb.67</b>	Pharmakokinetik des CsA im Vollblut und Nierengewebe im steady-state (n = 6, $x \pm \text{SEM}$ , ★ $p < 0.05$ )	109
<b>Abb.68</b>	Pharmakokinetik de CsA in den Organen Leber, Thymus und Milz im steady-state (n = 6, $x \pm \text{SEM}$ , ★ $p < 0.05$ )	110
<b>Abb.69</b>	Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der CM im Vollblut im steady-state (n = 6, $x \pm \text{SEM}$ , ★ $p < 0.05$ )	111
<b>Abb.70</b>	Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der CM im Nierengewebe im steady-state (n = 6, $x \pm \text{SEM}$ , ★ $p < 0.05$ )	112
<b>Abb.71</b>	Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der CM im Lebergewebe im steady-state (n = 6, $x \pm \text{SEM}$ , ★ $p < 0.05$ )	113
<b>Abb.72</b>	Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der CM im Thymusgewebe im steady-state (n = 6, $x \pm \text{SEM}$ , ★ $p < 0.05$ )	114
<b>Abb.73</b>	Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der CM im Milzgewebe im steady-state (n = 6, $x \pm \text{SEM}$ , ★ $p < 0.05$ )	115

## 11.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tab.01</b>	Statistik der Entwicklung der Wartelisten für verschiedene Organtransplantation. Stand 1998-2000, Eurotransplant.	11
<b>Tab.02</b>	Ätiologie der terminalen bzw. chronischen Niereninsuffizienz, Eurotransplant 2001.	12
<b>Tab.03</b>	Blutgruppenkompatibilität bei Organtransplantationen, ( <i>Burdick et al., 2001</i> )	13
<b>Tab.04</b>	Differenzierung der MHC-Gene	14
<b>Tab.05</b>	Gegenüberstellung der pharmakokinetischen Parameter des Sandimmun® und des Sandimmun Neoral® ( <i>Browne et al., 1994</i> ) ...	22
<b>Tab.06</b>	Pharmakokinetische Parameter (Tmax, Cmax, AUC) im Vollblut und den Organen im steady-state (n = 6, $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , ★ $p < 0.05$ vs. Neoral)	116
<b>Tab.07</b>	Pharmakokinetische Parameter (Tmax, Cmax, AUC) im Vollblut nach Transplantation, im Zustand der Niereninsuffizienz und unter IL-2 Gabe (n = 6, $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , ★ $p < 0.05$ )	116

## 11.3 Organspendeausweis



<b>Organspendeausweis</b> nach § 2 des Transplantationsgesetzes		
Organspende		
Name, Vorname		Geburtsdatum
Straße		PLZ, Wohnort
 <b>Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung</b>	 <b>Organspende</b> schenkt Leben.	
Kostenlose Auskunft erhalten Sie beim Infotelefon Organspende der Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung in Zusammenarbeit mit der Deutschen Stiftung Organtransplantation unter der Telefonnummer 0800/90 40 400.		
Erklärung zur Organspende	Für den Fall, dass nach meinem Tod eine Spende von Organen/Geweben in Frage kommt, erkläre ich:	
	<input type="radio"/> <b>JA</b> , ich gestatte, dass nach der ärztlichen Feststellung meines Todes meinem Körper Organe und Gewebe zur Transplantation entnommen werden.	
	<input type="radio"/> <b>JA</b> , ich gestatte dies, mit <b>Ausnahme</b> folgender Organe/Gewebe:	
	<input type="radio"/> <b>JA</b> , ich gestatte dies, jedoch <b>nur</b> für folgende Organe/Gewebe:	
	<input type="radio"/> <b>NEIN</b> , ich widerspreche einer Entnahme von Organen oder Geweben zur Transplantation.	
	<input type="radio"/> Ich habe die <b>Entscheidung übertragen</b> auf:	
	Name, Vorname <span style="float: right;">Telefon</span>	
	Straße <span style="float: right;">PLZ, Ort</span>	
Anmerkungen/Besondere Hinweise		
Datum		Unterschrift

## 11.4 Curriculum Vitae Apotheker Jens Köhler

### PERSÖNLICHE ANGABEN

- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Alter: 27 Jahre / Geburtsdatum : 06.05.1974
- Geburtsort: Erlangen / Bayern
- Eltern: Walter Köhler (Apotheker); Eleonora Köhler

### SCHULAUSBILDUNG

- 1980 –1985 Ignaz – Günther – Volksschule Altmannstein
- 1985 –1992 Katharinen – Gymnasium Ingolstadt
- 1992 –1994 Apian – Gymnasium Ingolstadt / Abiturprüfung 06/94

### WEHRDIENST

- 1994 –1995 Sanitätssoldat der Luftwaffe / Manching; Bayern

### STUDIUM / PRÜFUNGEN

- WS 1995 – SS 1999 Studium der Pharmazie an der Universität Regensburg / Bayern
- SS 1997 1. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
- SS 1999 2. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
- 11/2000 3. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
- 12/2000 Approbation als Apotheker
- SS 2002 Promotion zum Dr.rer.nat.
- SS2002 Studium der Medizin an der LMU München

### AUSZEICHNUNGEN / FÖRDERUNGEN

- WS 1998 Buchpreis des Lehrstuhls für Pharmakologie u. Toxikologie der Universität Regensburg / Prof. Dr. med. Grobecker
- SS 1999 Stipendium der Dr. August, Dr. Anni Lesmüller Stiftung / München

### BESCHÄFTIGUNGSVERHÄLTNISSE

- WS 1997/98 Studentische Hilfskraft im Bereich medizinische Mikrobiologie am Lehrstuhl für Pharmakologie der Universität Regensburg
- 11/1999 – 11/2000 Pharmaziepraktikant der Dom-Apotheke/ Regensburg.
- Tätigkeit in der elterlichen Mariahilf- Apotheke / Altmannstein
- seit 01/2000 Doktorand am Lehrstuhl f. Pharmakologie der Universität Regensburg